

**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA
ESCUELA DE BIOLOGÍA**



**PROGRAMA DE DIAGNÓSTICO FITOSANITARIO, SERVICIO FITOSANITARIO
DEL ESTADO, M.A.G.**

**“DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA DETECCIÓN DE
Ralstonia solanacearum RAZA 3 BIOVAR 2 EN PLANTAS USANDO LA
REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)”.**

INFORME DE TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN

Mario Alberto Espinoza Pizarro

CARTAGO, 2006

DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA DETECCIÓN DE *Ralstonia solanacearum* RAZA 3 BIOVAR 2 EN PLANTAS USANDO LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

Mario Espinoza Pizarro*

RESUMEN

Ralstonia solanacearum es una bacteria fitopatógena que causa incalculables pérdidas alrededor del mundo. En tiempos recientes *R. solanacearum* raza 3 biovar 2 ha tomado gran importancia debido a que no se encuentra diseminada por los Estados Unidos. Costa Rica como exportador de geranio, una de las especies afectadas, debe contar con un método para detectarla en muestras vegetales de exportación. Como los métodos tradicionales no llegan a identificar a nivel de biovar, las técnicas moleculares se convierten en una importante herramienta. Se planteó un método para la detección de esta bacteria por medio de PCR usando en primer lugar imprimadores específicos para la especie y en segundo lugar imprimadores específicos para el biovar 2. Las pruebas moleculares se apoyaron con una serie de pruebas preliminares que incluyeron desde el diagnóstico a nivel de síntomas hasta montajes al microscopio. Se determinó que los imprimadores escogidos cumplen con la función requerida y además que las pruebas preliminares de exudación del tallo y del kit ACL Immunostrips de Agdia® concuerdan y por lo tanto apoyan las pruebas moleculares

Palabras claves: *Ralstonia solanacearum*, raza 3, biovar 2, PCR, diagnóstico,

* INFORME DE TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 2006.

DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA DETECCIÓN DE *Ralstonia solanacearum* RAZA 3 BIOVAR 2 EN PLANTAS USANDO LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

Mario Espinoza Pizarro*

ABSTRAC

Ralstonia solanacearum is a phytopathogenic bacteria that cause incalculable losses around the world. In recent times *R. solanacearum* race 3 biovar 2 have taken great importance because it is not disseminated in the United States. Costa Rica like geranium exporter, one of the affected species, should have a method to detect it in export vegetables samples. As the traditional methods don't end up identifying at biovar level, the molecular techniques become an important tool. Here thought about a method for the detection of this bacteria by PCR using specific primers for the specie first and specific primers for the biovar 2 in second place. The molecular test leaned on a preliminary test that included from the diagnosis at symptoms level until microscopic observation. The chosen primers fulfills the required function and also it determined that the preliminary test like exudation test and *kit ACL Immunostrips* test agrees and therefore they support the molecular tests.

Keywords: *Ralstonia solanacearum*, diagnosis, race 3, biovar 2, PCR

* INFORME DE TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 2006.

**DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA DETECCIÓN DE
Ralstonia solanacearum RAZA 3 BIOVAR 2 EN PLANTAS USANDO LA
REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).**

ACREDITACIÓN

**Informe presentado a la Escuela de Biología del
Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial
para optar al título de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología.**

Miembros del Tribunal

**M. Sc. Johnny Peraza,
Profesor Asesor-ITCR**

**Ing. Marcela Jiménez,
Asesor- Institución**

**M. Sc. Claudia Zúñiga,
Lectora**

DEDICATORIA

*D*edico este trabajo a Dios que me dio las fuerzas y muy especialmente a mis padres Zeneida Pizarro y Esmeraldo Espinoza así como a mis hermanos, con mucho cariño por su incondicional apoyo para que lograra cumplir mis metas.

Mario

AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar a Dios por bendecirme y darme las fuerzas para lograr terminar esta fase de mi vida.

A toda mi familia y amigos que me tendieron la mano y estuvieron conmigo durante mi formación profesional, es especial a Anabelle Pizarro por brindarme su hogar. Y a Seilyn por ser mi compañía y ayuda en los momentos más difíciles.

Al personal docente y administrativo de la Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica, por sus inestimables aportes en mi formación como persona y como profesional. Y al ITCR por financiar mis estudios.

Al personal del Programa de Diagnóstico Fitosanitario, por la enorme colaboración, gentileza y amabilidad para con mi persona y al Servicio Fitosanitario del Estado (MAG); por el apoyo logístico y financiero para la ejecución de este trabajo.

En especial a mis tutores: M.Sc. Johnny Peraza y Ing. Marcela Jiménez, por su enorme paciencia, ayuda y orientación técnica y a la lectora M.Sc. Claudia Zúñiga por su valiosa colaboración y sugerencias.

Y por último a todos mis compañeros y compañeras que de una u otra forma me ayudaron y estuvieron conmigo durante todo el tiempo que me tomó culminar exitosamente este proceso.

A todos de verdad muchas gracias.

INDICE GENERAL

RESUMEN	2
ABSTRAC	3
ACREDITACIÓN.....	4
DEDICATORIA.....	5
AGRADECIMIENTOS.....	6
INDICE GENERAL	7
INDICE DE CUADROS.....	11
INDICE DE FIGURAS	12
INDICE DE ANEXOS.....	14
1. INTRODUCCIÓN	15
2. REVISION DE LITERATURA	18
2.1. <i>R. SOLANACEARUM</i> COMO MICROORGANISMO FITOPATÓGENO.	18
2.1.1. <i>Información taxonómica</i>	18
2.1.2. <i>Hospederos</i>	21
2.1.3. <i>Distribución Geográfica</i>	23
2.1.4. <i>Biología y ecología de la bacteria.</i>	23
2.2. IMPORTANCIA FITOSANITARIA DE LA BACTERIA.	26
2.3. SÍNTOMAS Y SIGNOS DE LA ENFERMEDAD.	30
2.4. CONTROL DE LA BACTERIA	32
2.5. GENOMA DE LA BACTERIA	32
2.6. DETECCIÓN Y DIAGNÓSTICO.....	34
2.6.1. <i>Las pruebas de selección rápida</i>	37
2.6.2. <i>Aislamiento en medio de cultivo selectivo</i>	38
2.6.3. <i>Pruebas de confirmación</i>	40
2.6.4. <i>Pruebas de patogenicidad.</i>	44
2.7. MÉTODOS DE DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN BASADOS EN LA PRESENCIA DE ÁCIDOS NUCLEICOS ESPECÍFICOS DEL PATÓGENO.....	44
2.7.1. <i>Técnicas de Hibridación</i>	44

2.7.2. Técnicas de PCR-RFLP	46
2.7.3. Técnicas de Rep-PCR	48
2.7.4. La técnica de PCR con imprimadores específicos.....	50
3. IMPORTANCIA Y JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO.....	54
4. OBJETIVOS.....	55
4.1. OBJETIVO GENERAL.....	55
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	55
5. MATERIALES Y MÉTODOS	56
5.1. DESCRIPCIÓN DEL MATERIAL UTILIZADO	56
5.1.1. Material de campo.....	56
5.1.2. Material de referencia.	58
5.2. PRUEBAS PRELIMINARES PARA LA DETECCIÓN DE <i>R. SOLANACEARUM</i>	60
5.2.1. Prueba de exudación del tallo.	60
5.2.2. Aislamiento de <i>R. solanacearum</i> en medio de cultivo	61
5.2.3. Montaje al microscopio y tinción de bacterias aisladas	62
5.2.4. Prueba rápida con el kit Agdia® ACL® - Rs inmunostrip para la detección de <i>R. solanacearum</i>	64
5.3. AISLAMIENTO Y CUANTIFICACIÓN DE ADN DE LAS MUESTRAS ANALIZADAS	64
5.3.1. Aislamiento de ADN de tejido vegetal	64
5.3.2. Extracción de ADN de cultivo bacteriano	64
5.3.3. Extracción de ADN bacteriano a partir del exudado del tallo.....	65
5.4. CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS POR ESPECTROFOTOMETRÍA	65
5.5. DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE <i>R. SOLANACEARUM</i>	66
5.5.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección de la especie <i>R. solanacearum</i>	66
5.5.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa para la detección del biovar 2 de <i>R. solanacearum</i>	70
5.6. ELECTROFORESIS Y VISUALIZACIÓN DE LAS AMPLIFICACIONES.....	74
6. RESULTADOS	76
6.1. ANÁLISIS DE LOS SÍNTOMAS DE LAS PLANTAS MUESTREADAS.	76

6.2. PRUEBAS PRELIMINARES PARA LA DETECCIÓN DE <i>R. SOLANACEARUM</i>	78
6.2.1. Prueba de exudación del tallo.	78
6.2.2. Aislamiento de <i>R. solanacearum</i> en medio de cultivo	79
6.2.3. Montaje al microscopio y tinción de bacterias aisladas	83
6.2.4. Prueba rápida con el kit Agdia® ACL® - Rs inmunostrip para la detección de <i>R. solanacearum</i>	85
6.3. AISLAMIENTO Y CUANTIFICACIÓN DE ADN DE LAS MUESTRAS ANALIZADAS	87
6.3.1. Aislamiento de ADN de tejido vegetal	87
6.3.2. Extracción de ADN de cultivo bacteriano	87
6.3.3. Extracción de ADN bacteriano a partir del exudado del tallo.....	88
6.4. DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE <i>R. SOLANACEARUM</i>	88
6.4.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección de la especie <i>R. solanacearum</i>	88
6.4.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa para la detección del biovar 2 de <i>R. solanacearum</i>	92
7. DISCUSIÓN	96
7.1. ANÁLISIS DE LOS SÍNTOMAS DE LAS PLANTAS MUESTREADAS	96
7.2. PRUEBAS PRELIMINARES PARA LA DETECCIÓN DE <i>R. SOLANACEARUM</i>	98
7.2.1. Prueba de exudación del tallo	98
7.2.2. Aislamiento de <i>R. solanacearum</i> en medio de cultivo	99
7.2.3. Montaje al microscopio y tinción de bacterias aisladas	103
7.2.4. Prueba rápida con el kit Agdia® ACL® - Rs inmunostrip para la detección de <i>R. solanacearum</i>	105
7.3. AISLAMIENTO Y CUANTIFICACIÓN DE ADN DE LAS MUESTRAS ANALIZADAS	106
7.3.1. Aislamiento de ADN de tejido vegetal	106
7.4. DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE <i>R. SOLANACEARUM</i>	108
7.4.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección de la especie <i>R. solanacearum</i>	108
7.4.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa para la detección del biovar 2 de <i>R. solanacearum</i>	112
7.5. EVALUACIÓN GLOBAL DEL PROCEDIMIENTO DE DETECCIÓN	115

CONCLUSIONES	117
RECOMENDACIONES	118
BIBLIOGRAFÍA.	119

INDICE DE CUADROS

Cuadro 2.1 Prueba de patogenicidad para la determinación de razas de <i>R. solanacearum</i>	20
Cuadro 2.2 Determinación de biovars de <i>R. solanacearum</i> según su capacidad de producir ácido de tres hexosas alcohólicas y tres azúcares.	21
Cuadro 2.3 Hospederos de <i>R. solanacearum</i> raza 3.	22
Cuadro 5.1 Material vegetal de especies afectadas usado en el estudio.	58
Cuadro 5.2 Material de referencia de <i>R. solanacearum</i> usado como controles en las pruebas moleculares.....	60
Cuadro 5.3 Mezcla de reacción tomada como base para la detección molecular de <i>R. solanacearum</i> a nivel de especie.....	68
Cuadro 5.4 Perfil térmico tomado como base para la detección molecular de <i>R. solanacearum</i> a nivel de especie.....	70
Cuadro 5.5 Mezcla de reacción tomada como base para la detección molecular de <i>R. solanacearum</i> a nivel de biovar 2.	72
Cuadro 5.6 Perfil térmico tomado como base para la detección molecular de <i>R. solanacearum</i> a nivel de biovar 2.	74
Cuadro 6.1 Resultados obtenidos en la prueba de exudación del tallo de las diferentes muestras analizadas.	79
Cuadro 6.2 Resultados obtenidos en los diferentes aislamientos de bacterias presentes en las muestras analizadas.....	82
Cuadro 6.3 Descripción microscópica de colonias presentes en los aislamientos de bacterias presentes en las muestras analizadas	84
Cuadro 6.4 Resultados obtenidos en la prueba con el <i>kit Agdia® ACL® - Rs immunostrip</i> con las diferentes muestras analizadas.	86
Cuadro 6.5 Resultados obtenidos en la prueba de PCR para el diagnóstico de <i>R. solanacearum</i> a nivel de especie.....	91

INDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 Micrografía de <i>R. solanacearum</i> cepa GM 1000.	23
Figura 2.2 Micrografía mostrando un vaso vascular de papa infectado por la presencia de <i>R. solanacearum</i>	25
Figura 2.3 Planta de tomate mostrando los síntomas característicos de una infección con <i>R. solanacearum</i>	30
Figura 2.4 Síntomas de una infección con <i>R. solanacearum</i> en plantas de geranio.	31
Figura 2.5 Distribución de los genes en el genoma completo de <i>R. solanacearum</i>	34
Figura 2.6 Esquema a seguir para hacer un diagnóstico de <i>R. solanacearum</i> en papa.	36
Figura 2.7 Tinción de los gránulos PHB de <i>R. solanacearum</i> con negro Sudán.....	38
Figura 2.8. Aislamiento de <i>R. solanacearum</i> en medio TZC.....	40
Figura 2.9 Perfil bioquímico de <i>R. solanacearum</i> usado para su identificación.....	41
Figura 2.10 Huella genómica de Rep-PCR de diferentes cepas bacterianas de <i>R. solanacearum</i>	49
Figura 2.11 Electroforesis de la PCR de diferentes cepas de <i>R. solanacearum</i> usando los imprimadores B2-I-F y B2-II-R.....	53
Figura 6.1 Síntomas observados en plantas de geranio muestreadas.	76
Figura 6.2 Síntomas observados en plantas de tomate muestreadas, Muestra Ts-01, se observa la marchitez generalizada.	77
Figura 6.3 Muestra Ts-01 mostrando un resultado positivo en la prueba de exudación del tallo	78
Figura 6.4 Aislamientos bacterianos obtenidos a partir de diferentes muestras analizadas.	81
Figura 6.5 Bacterias observadas en los montajes al microscopio.	85
Figura 6.6 Resultado de prueba con el <i>kit Agdia® ACL® - Rs inmunostrip</i> con las diferentes muestras analizadas.	86
Figura 6.7 Amplificación de ADN con imprimadores OLI-1 y Y-2 para los controles positivos de <i>R. solanacearum</i> suministrados por el CIP.....	88
Figura 6.8 Amplificación de ADN con imprimadores OLI-1 y Y-2, mostrando diferentes concentraciones de imprimadores..	89

Figura 6.9 Amplificación de ADN con imprimadores OLI-1 y Y-2, mostrando diferentes temperaturas de hibridación de los imprimadores.	90
Figura 6.10 Amplificación con imprimadores OLI-1 y Y-2, utilizando la mezcla de reacción y el perfil térmico final para la detección a nivel de especie.....	92
Figura 6.11 Amplificación con imprimadores B2-I-F y B2-II-R para los controles positivos de <i>R. solanacearum</i> suministrados por el CIP.....	93
Figura 6.12 Amplificación de ADN con imprimadores B2-I-F y B2-II-R mostrando diferentes concentraciones de ADN blanco de la muestra ICMP#8049..	94
Figura 6.13 Amplificación de ADN con imprimadores B2-I-F y B2-II-R mostrando diferentes temperaturas de hibridación de los imprimadores..	95
Figura 6.14 Amplificación de ADN con imprimadores B2-I-F y B2-II-R mostrando diferentes concentraciones de Cloruro de Magnesio.....	95

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Distribución Geográfica de la raza 3 de <i>Ralstonia solanacearum</i>	126
Anexo 1. Distribución Geográfica de la raza 3 de <i>Ralstonia solanacearum</i>	127
Anexo 2. Información de los imprimadores OLI-1 y Y-2.....	128
Anexo 3. Información de los imprimadores B2-I-F y B2-II-R.....	129
Anexo 4. Composición y preparación de los medios de cultivo para el aislamiento de <i>R. solanacearum</i>	130
Anexo 5. Procedimiento <i>kit</i> ACL-Immunostrips para <i>R. solanacearum</i> agdia®.....	131
Anexo 6. Procedimiento aislamiento de ADN con el <i>kit Wizard</i> de Promega® a partir de tejido vegetal.....	132
Anexo 7. Procedimiento aislamiento de ADN con el <i>kit Wizard</i> de Promega® a partir de cultivo bacteriano.....	133
Anexo 8. Lista de plagas cuarentenarias para la NAPPO (zona norteamericana); se resalta <i>R. solanacearum</i>	134
Anexo 9. Anticuerpos, imprimadores y sondas aceptables para la detección serológica y molecular de plagas cuarentenarias de la papa según la NAPPO.....	135
Anexo 10. Cuantificación de las extracciones de ADN llevadas a cabo en el presente estudio.	136
Anexo 11. Región del ADN de <i>R. solanacearum</i> amplificada por los imprimadores OLI-1 y Y-2.....	137

1. INTRODUCCIÓN

La fitopatología requiere de estrategias eficientes para el diagnóstico de plagas y enfermedades, ya que los métodos tradicionales aunque todavía tienen validez y significancia, no brindan soluciones eficientes a nuevos retos como lo son la clasificación de microorganismos a nivel intraespecífico.

R. solanacearum es una bacteria fitopatógena extendida ampliamente y que ataca una gran cantidad de cultivos de importancia mundial, entre estos: papa, tomate, chile y muchas especies ornamentales; además, se ha reportado su presencia en cultivos silvestres.

A lo largo de la historia se han dado enormes pérdidas en todo el mundo a causa de este microorganismo, ya que los síntomas que produce terminan eliminado completamente la planta, por lo que la producción es casi nula.

Esta especie bacteriana consta de una compleja división taxonómica. Se divide en 5 razas que están dadas por el hospedero en que son encontradas y dentro de cada una de estas razas se pueden encontrar 5 biovares que están dados por diferentes propiedades bioquímicas. Por último, ciertos biovares como el biovar 2 se dividen en subfenotipos de acuerdo a la utilización de ciertos azúcares.

En Costa Rica, la bacteria está presente desde hace mucho tiempo y afecta principalmente a Solanáceas de importancia agrícola. Además se ha descrito esta bacteria en plantas de geranio (*Pelargonium sp*), tratándose en ambos casos de la raza 3.

Las normas internacionales de comercio y los reglamentos fitosanitarios se han establecido para evitar que el intercambio de productos agrícolas se convierta en una vía para la transmisión de plagas y enfermedades de un país a otro. Existen muchos organismos e instituciones a nivel tanto nacional como internacional encargadas de cumplir esta función.

En Costa Rica esa función fue encomendada al Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), el cual por medio del Servicio Fitosanitario del Estado lleva a cabo la inspección del material de exportación e importación, para determinar su estado fitosanitario y si cumple con los requisitos para poder ser importado o exportado.

R. solanacearum raza 3 biovar 2, está reportada para Costa Rica, en Estados Unidos en cambio está presente la especie en otras razas y biovares pero no la raza 3 biovar 2. Por lo anterior este país tiene como requisito fitosanitario de importación una certificación que indique que el material se encuentre libre de este patógeno. Nuestro país como productor y exportador de geranio requiere de un método para el diagnóstico a este nivel.

Los métodos de diagnóstico tradicional pueden determinar la presencia de la bacteria a nivel de especie, lo cual no es suficiente, por lo que el Laboratorio de Diagnóstico Fitosanitario del MAG necesitaba otra alternativa. Los métodos moleculares surgen como una alternativa viable dada la especificidad y simplicidad con que se llevan a cabo.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es un método de apoyo a los métodos tradicionales que presenta una alta sensibilidad y relativa facilidad. Esta es una técnica de laboratorio utilizada para amplificar secuencias específicas de ADN mediante la extensión simultánea de las cadenas complementarias a partir de un imprimador. Por lo que si se utilizan los imprimadores adecuados, esta técnica permite discriminar entre diferentes biovares constituyéndose en una potencial herramienta para ser usada en la certificación de las exportaciones de nuestro país, beneficiando a productores y al Estado.

En el presente estudio se pretende establecer un protocolo que permita la detección de la bacteria *R. solanacearum* raza 3 biovar 2 en muestras vegetales mediante el uso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa.

Para lograr tal objetivo se recurrirá a algunas pruebas preliminares que puedan de cierta forma ayudar en el proceso de diagnóstico y que confirmen el resultado.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1. *R. solanacearum* como microorganismo fitopatógeno.

R. solanacearum es una bacteria fitopatógena de gran importancia a nivel mundial debido a las enormes pérdidas económicas que causa. Ataca una amplia variedad de cultivos y también se puede encontrar en plantas silvestres (Jones *et al.*, 1991).

El principal efecto fisiológico que causa en sus hospederos se denomina marchitez, que se da cuando las hojas pierden turgencia y decaen junto con toda la planta, debido a una obstrucción de los tejidos conductores que transportan el agua y nutrientes a través del tallo (Gabor y Wiebe, 1997).

R. solanacearum se conoce por provocar la enfermedad llamada marchitez bacteriana, cuando aparece en cultivos como la papa, tomate, tabaco o chile y como marchitez del Sur cuando se da en geranio. Además, recibe otros nombres como “moco” del banano y podredumbre parda de la papa (CABI, 2003).

Se ha descrito a esta bacteria como un microorganismo muy infeccioso, sin embargo, en cultivo, muta con mucha facilidad perdiendo su patogenicidad. Sus propiedades han llevado a investigadores de todo el mundo a analizarlo, siendo uno de los microorganismos más estudiados en la historia; incluso, algunos lo señalan como el fitopatógeno más importante del mundo (APHIS y PPQ, 2004).

2.1.1. Información taxonómica

Esta bacteria ha sido denominada de diferentes formas; dadas las nuevas técnicas de clasificación y de estudio de sus propiedades su clasificación ha cambiado varias veces hasta llegar a la clasificación que posee ahora, y no se descarta que pueda volver a cambiar (Hayward, 1994).

Entre los nombres asignados se encuentran: *Bacillus solanacearum*, *Bacterium solanacearum* var. *asiaticum*, *Burkholderia solanacearum*, *Erwinia solanacearum*, *Pseudomonas solanacearum*. De estos el que todavía persiste en el medio es *Pseudomonas solanacearum* (CABI, 2003).

Sin embargo el nombre científico más aceptado en la actualidad es *R. solanacearum*, propuesto por Yabuuchi y colaboradores en 1995, debido a las evidentes diferencias que presentaba esta especie con respecto a los géneros *Burkholderia* y *Pseudomonas* (Hayward, 1991).

Actualmente su taxonomía se describe de la siguiente forma (APHIS y PPQ, 2004)

Domimio Bacteria

Phylum: Proteobacteria

Clase: Betaproteobacteria

Orden: Burkholderiales

Familia: Ralstoniaceae

Género y especie: *Ralstonia solanacearum*

La bacteria presenta una compleja clasificación intraespecífica, compuesta por 5 razas, dadas por el hospedero en que se encuentre. Además, cada una de las razas puede presentar 5 biovares definidos según ciertas propiedades bioquímicas, y por último, existen biovares que presentan formas especiales o subfenotipos. Este es el caso del biovar 2, dividido en las formas especiales biovar 2, 2T y 2A determinados por el uso de algunos azúcares (Kim y Olson, 2003).

La raza es el término más discutido ya que como se dijo se define de acuerdo al hospedero y a los daños que causa. Sin embargo hay una enorme variedad de plantas cultivadas y silvestres que pueden ser afectadas; una misma especie puede ser infectada por diferentes razas lo que pasa principalmente en Solanáceas y provoca incertidumbre en su clasificación. Se ha propuesto una forma de clasificar la raza por medio de una prueba de patogenicidad en plantas de tomate, berenjenas y tabaco; tomando en cuenta los resultados de la reacción de hipersensibilidad (HR) en hojas de tabaco (cuadro 2.1) (Kim y Olson, 2003).

Cuadro 2.1 Prueba de patogenicidad para la determinación de razas de *R. solanacearum*

Reacción en	Raza		
	1	2	3
Plantas de tomate/berenjena	Marchitamiento	Sin reacción	Marchitamiento
Plantas de tabaco	Marchitamiento	Sin reacción	Sin reacción
Hojas de tabaco	Necrosis (48 h) y marchitamiento (-8 días)	HR (12-24 h)	Clorosis (2-8 días)
La raza 4 (patógena en jengibre y algún otro huésped) y la raza 5 (patógena sólo en mora) no están incluidas			

Fuente: Directiva del Consejo UE, 1998.

Además de los cultivos mencionados se puede decir de forma general que es posible encontrar la raza 1 en berenjena, banano diploide y Solanáceas. La raza 2 se encuentra en banano triploide y heliconias. La raza 3 en Solanáceas y geranio. La raza 4 en zingiberáceas y la raza 5 en mora. Pero es posible que existan en cada raza muchos otros hospederos (CABI, 2003).

R. solanacearum se clasifica en biovares en función de la capacidad de producir ácido de tres hexosas alcohólicas y tres azúcares (cuadro 2.2).

Cuadro 2.2 Determinación de biovars de *R. solanacearum* según su capacidad de producir ácido de tres hexosas alcohólicas y tres azúcares.

Utilización de	Biovar				
	1	2	3	4	5
Maltosa	-	+	+	-	+
Lactosa	-	+	+	-	+
Celobiosa	-	+	+	-	+
Manitol	-	-	+	+	+
Sorbitol	-	-	+	+	-
Dulcitol	-	-	+	+	-

Fuente: Hayward, 1994

El biovar 2 se diferencia en subfenotipos mediante pruebas adicionales, que incluyen la utilización de azúcares como trehalosa e inositol, además por medio de la medida de la actividad pectolítica (Hayward, 1994).

2.1.2. Hospederos

La presente investigación se centrará en los hospederos de la raza 3, detallados en el cuadro 2.3.

Cuadro 2.3 Hospederos de *R solanacearum* raza 3.

Tipo de Hospedero	Nombre Común	Nombres Científicos
Plantas Cultivadas	Geranio	<i>Pelargonium sp</i> <i>Geranium sp</i>
	Tomate	<i>Lycopersicum esculentum</i>
	Chile	<i>Capsicum spp</i>
	Berenjena	<i>Solanum melongena</i>
	Papa	<i>Solanum tuberosum</i>
	Frijol	<i>Phaseolus vulgaris</i>
	Calabaza amarga	<i>Momordica charantia</i>
	Remolacha	<i>Beta vulgaris</i>
Plantas Silvestres	Hierba mora negra	<i>Solanum nigrum</i>
	Hierba mora trepadora	<i>Solanum dulcamara</i>
	Ortiga de caballo	<i>Solanum carolinense</i>
	Mala hierba	<i>Datura stramonium</i>
	Verdolaga	<i>Portulaca oleracea</i>
	Mostaza	<i>Brassica spp</i>
	“Lambsquarters”	<i>Chenopodium album</i>
	Pie negro perfoliado	<i>Melampodium perfoliatum</i>
	Zumbido de Narrawa	<i>Solanum cinereum</i>
	otras menos comunes	<i>Drymaria cordata</i> <i>Polygonum capitatum</i> <i>Cerastium glomeratum</i> <i>Urtica dioica</i>

Fuente: Kim y Olson, 2003.

2.1.3. Distribución Geográfica

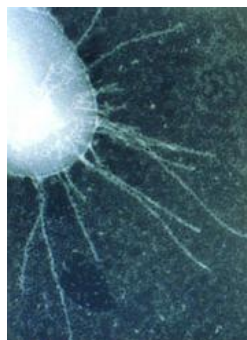
No existe una lista oficial de distribución geográfica de la bacteria *R. solanacearum* como tal. Las autoridades encargadas han publicado listas para cada una de las razas, y con base en éstas, se podría decir que la bacteria se encuentra extendida por todo el mundo en sus diferentes razas (USDA *et al.*, 2003).

En general la bacteria se encuentra dispersa en las zonas tropicales, subtropicales y de clima caliente. Sin embargo en las zonas templadas, también se han reportado apariciones de esta bacteria tal es el caso de Europa con la raza 3 (CABI, 2003).

En cuanto a la raza 3 que es en este momento la que interesa, existe una lista actualizada al año 2002. Esta fue publicada por cada uno de los organismos de cada región y se detalla en el anexo 1.

2.1.4. Biología y ecología de la bacteria.

R. solanacearum es un bacilo gram negativo, de 0.5 a 0.7 μm de ancho por 1.5 a 2.0 μm de largo. Presenta motilidad gracias a la presencia de uno a cuatro incluso más flagelos polares (figura 2.1) (Jones *et al.*, 1991).



Fuente: Salanoubat, 2002.

Figura 2.1 Micrografía de *R. solanacearum* cepa GM 1000.

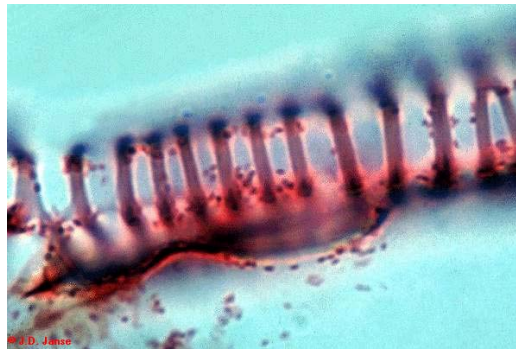
Esta bacteria se caracteriza por ser aeróbica, catalasa y oxidasa positiva y además tiene la capacidad de formar nitritos a partir de nitratos. Al igual que otras bacterias relacionadas que no son fluorescentes, *R. solanacearum* produce unas inclusiones intracelulares, refráctiles que son sudanofílicas y que consisten en ácido polihidroxi-butírico (PHB) (EPPO, 2004).

Existen muchas otras propiedades bioquímicas y enzimáticas que definen a esta bacteria, sin embargo estas serán detalladas más adelante cuando se describa cuáles de esas propiedades se utilizan para determinar y caracterizar su presencia (Gabor y Wiebe, 1997).

La bacteria se dispersa principalmente a través del suelo, sobreviviendo en este medio por largos periodos de tiempo. Además es posible su transmisión por medio del agua, equipo o por materiales biológicos infectados. Por ejemplo, se puede diseminar por medio del trasplante y la propagación de plantas infectadas, cuando se realizan cortes sin desinfectar el equipo que previamente ha tenido contacto con una planta infectada y una importante forma de diseminación se da por medio del riego (APHIS y PPQ, 2004).

La propagación natural de la mayoría de sus razas es muy limitada y lenta, por lo que las medidas preventivas de sanidad son de gran importancia para detener su propagación. Sin embargo, hay datos de una posible transmisión de la bacteria por medio de insectos para el caso de la raza 2 y en otros casos se nombra la aparición de ciertas hierbas que ayudan en la propagación de la enfermedad (CABI, 2003).

La infección típica en la planta se inicia a través de las raíces, dañando zonas radicales y procesos como el crecimiento de raíces secundarias. Una vez dentro de la planta, la bacteria se multiplica y se mueve por el tejido vascular concentrándose en la base del tallo, donde su principal efecto es la obstrucción de los tejidos al paso de sustancias necesarias para la planta. A partir de aquí, se esparce en pocas cantidades por el resto de la planta, pudiéndose encontrar en una infección tardía casi en toda la planta (figura 2.2) (CABI, 2003).



Fuente: CABI, 2003

Figura 2.2 Micrografía mostrando un vaso vascular de papa infectado por la presencia de *R. solanacearum*.

El patógeno en el campo realmente no se dispersa por contacto de planta a planta, a través de salpicaduras o por el aire. Su diseminación en invernaderos se puede controlar por medio de la aplicación de estrictas medidas de sanidad (Kim y Olson, 2003).

La enfermedad es más severa a una temperatura entre 24-35° C, rara vez se encuentra en climas templados donde las temperaturas para cualquier semana de la temporada de invierno se pueden encontrar principalmente bajo los 10° C. Lo cual se convertiría en un impedimento para el crecimiento de la bacteria (Hudelson, 1999).

2.2. Importancia fitosanitaria de la bacteria.

R. solanacearum es una plaga cuarentenaria categoría A2 según la *European and Mediterranean Plant Protection Organization* (EPPO), y también es de alto significado para otras organizaciones a nivel mundial. La aparición de diferentes razas y biovars de la bacteria con variaciones en cuanto a la virulencia bajo diferentes condiciones ambientales, presenta un serio peligro para la producción de papa y tomate de las regiones Europeas y Mediterráneas. Por tanto, la ausencia de este patógeno en un país se considera como una gran ventaja a la hora de exportar este tipo de cultivos en el mercado mundial (USDA *et al.*, 2003).

América Latina es una de las regiones donde este patógeno se encuentra más distribuido, sobre todo la raza 3. Esto representa un gran problema ya que esta región es productora de gran cantidad de cultivos como la papa, tomate, chile e incluso geranio como el caso de Costa Rica. Cultivos que son hospederos preferidos de la bacteria (USDA *et al.*, 2003).

Existe un interés particular de los Estados Unidos por *R. solanacearum* raza 3 biovar 2 porque ataca cultivos sembrados en ese país como berenjena, geranios, papa y tomate. El problema radica en que *R. solanacearum* raza 3 biovar 2 todavía no se ha extendido por este país, por lo que es considerada de importancia cuarentenaria (EPPO, 2004).

La raza 1 (biovars 1 y 3) ha sido encontrada en invernaderos de cultivos ornamentales en el hemisferio Norte. Esta raza también tiene un rango de hospederos más grande en el Sureste de los Estados Unidos (NAPPO, 2003).

Existen reportes un poco dudosos de la presencia de *R. solanacearum* raza 3 biovar 2, en ciertas plantas de geranios en la parte Oeste de Australia y Tanganyika. En los Estados Unidos (1997), un estudio de hospederos usando un tipo de *R. solanacearum* aislada de una planta híbrida de geranio *Pelargonium x hortorum* (= *P. zonale*) indicó la presencia de la raza 3. Este hecho provocó una crisis fitosanitaria que intensificó los requisitos que eran pedidos a los países exportadores (EPPO, 2004).

En 1999, *R. solanacearum* raza 3 biovar 2, fue reportada en geranios comerciales (*P. zonale*) en los Estados Unidos, los cuales habían sido importados de Guatemala y distribuidos en las ciudades de New Jersey, New York, Ohio, Pennsylvania, South Dakota y Wisconsin. Esto se logró mediante la revisión de los sitios que exportaban estas plantas a los Estados Unidos (APHIS y PPQ, 2004).

En el mismo año, la bacteria fue encontrada en el Reino Unido en estacas de geranios importados procedentes de Kenia, para una marca europea. Durante el periodo de septiembre a diciembre del 2000, los síntomas de la marchitez bacteriana fueron observados en muchos geranios tanto en Bélgica como en Alemania (Janse *et al.*, 2004).

Recientemente se han reportado casos de *R. solanacearum*, como por ejemplo en el año 1995 que se recibieron plantas contaminadas provenientes de Connecticut, las cuales contenían una bacteria que había sido aislada inicialmente de una planta de geranio de origen guatemalteco. También se ha confirmado un tipo similar de marchitez en plantas de geranio en invernaderos en Pennsylvania entre el año 1999 y 2000 y en Delaware en el año 1999, de plantas importadas desde Guatemala (APHIS y PPQ, 2004).

En febrero del año 2003, plantas de geranio importadas desde Kenia a los Estados Unidos fueron implicadas como una fuente de *R. solanacearum* raza 3 biovar 2, que terminó con la detección de 127 individuos infectados en viveros en 27 estados diferentes. Como consecuencia de esto las importaciones de Kenia fueron completamente detenidas y se implementaron medidas fitosanitarias para todos los geranios importados de países que tuvieran esta bacteria (EPPO, 2004).

Las detecciones realizadas a inicios del 2003 en los Estados Unidos se presentaron en invernaderos donde las infecciones fueron contenidas. Aquí las plantas se destruyeron y la enfermedad se erradicó a través de prácticas industriales y programas de control (EPPO, 2004).

A finales del año 2003 se implementó un programa de certificación para geranios producidos fuera de los Estados Unidos, por lo que se requiere de medidas específicas de sanidad en los cultivos y controles regulares para poder exportar a este país. Las plantas de geranio exportadas a Estados Unidos requieren una certificación fitosanitaria y un informe que demuestre que están libres de *R. solanacearum* raza 3, biovar 2 (APHIS y PPQ, 2004).

Debido a que esta bacteria es cuarentenaria en los Estados Unidos y existe peligro de que pueda pasarse a cultivos como la papa y el tomate, *R. solanacearum* raza 3 biovar 2 se encuentra bajo las regulaciones de la ley de Bioterrorismo (APHIS y PPQ, 2004).

En cuanto a los costos económicos que ha significado la existencia de esta bacteria se puede afirmar que, se ha estimado que la marchitez bacteriana de la papa afecta alrededor de 80 países en todo el mundo, causando daños que exceden los \$950 millones por año (APHIS y PPQ, 2004).

Esta bacteria está adaptada a bajas temperaturas y puede dañar la producción de papa de una manera muy severa en varias zonas de los Estados Unidos. Mientras la raza 1 provoca pérdidas a plantaciones de tomate en la Florida, el efecto de la raza 3 en tomates y otras tipos de Solanáceas en los Estados Unidos todavía es desconocido (USDA *et al.*, 2003).

En geranio la marchitez bacteriana aparece en diferentes medidas según sea el caso específico. En Abril de 1999, en Pennsylvania (PA) las pérdidas en plantas de geranio fueron del 10-40% de siete diferentes variedades que se habían propagado para su venta. Mientras tanto en Marzo del 2000, un vivero de Pennsylvania tuvo pocas pérdidas a causa de este problema, pero en Abril de ese mismo año otro vivero de PA perdió el 20% de los geranios debido a una infección con *R. solanacearum* raza 3 biovar 2 (NAPPO, 2003).

Cerca de 1000 viveros fueron analizados en los Estados Unidos durante el año 2003, lo cual arrojó que 127 viveros en 27 estados contenían infecciones con *R. solanacearum* raza 3 biovar 2. Más de 3 millones de plantas fueron destruidas, y las pérdidas ascendieron a los \$6 millones, además de los \$880 000 que se gastaron en operaciones regulatorias (Kim y Olson, 2003).

Como se puede ver los daños son cuantiosos, eso sin contar las pérdidas que se dan en las zonas más subdesarrolladas donde el pequeño agricultor sufre casi la merma de toda su plantación cuando es infectada por este patógeno. Y aunque oficialmente la raza 3 biovar 2 no se encuentra en los EEUU, los pocos casos en que se ha encontrado han sido por importaciones contaminadas (CABI, 2003).

2.3. Síntomas y signos de la enfermedad.

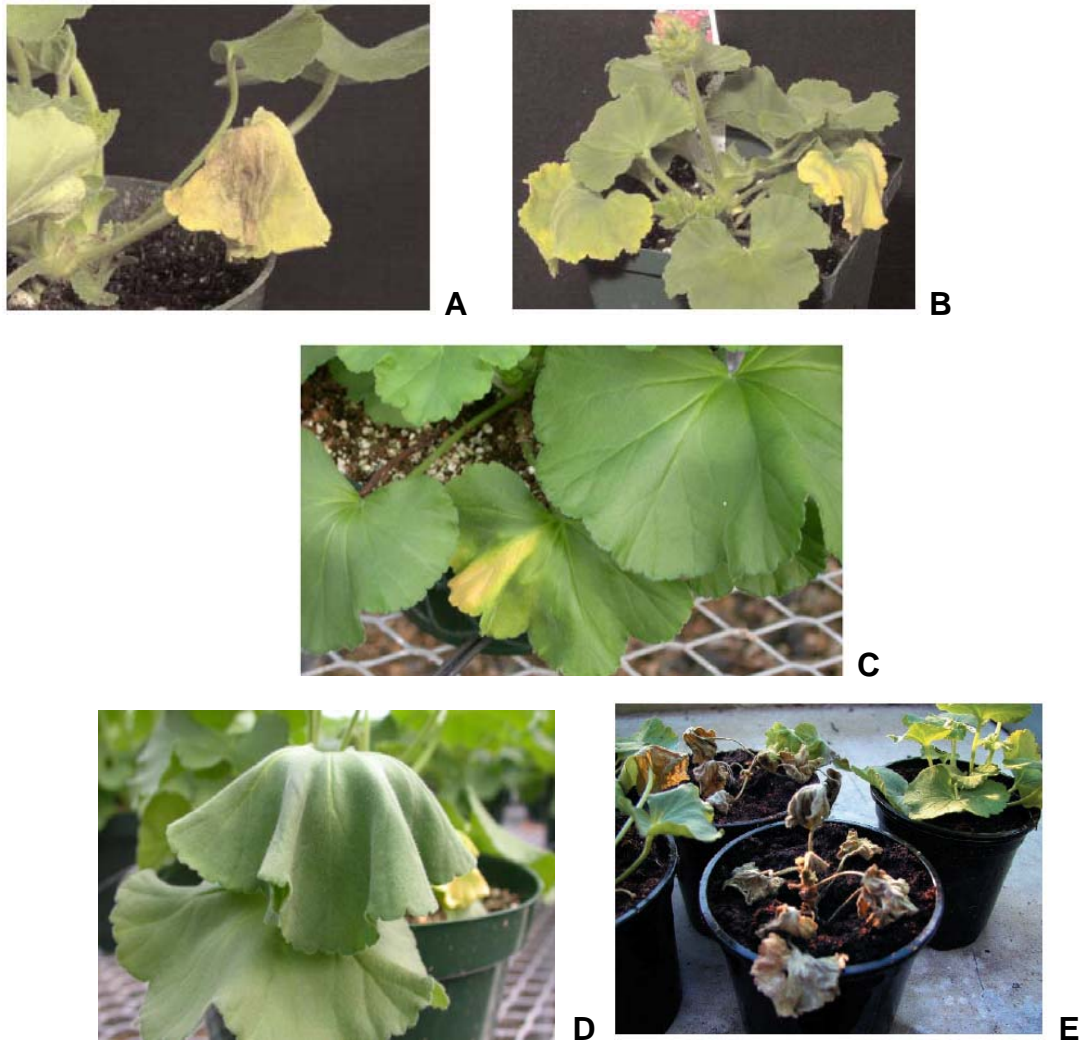
En plantas de la familia *Solanacea*, los síntomas inician con la caída de las hojas basales seguido por la marchitez total de la planta (figura 2.3). El amarillamiento foliar no está relacionado con esta enfermedad cuando se habla de Solanáceas. Cuando se lleva a cabo un corte longitudinal del tallo, se aprecia una decoloración vascular que va desde un color amarillo a café claro, que se oscurece y se ahueca a medida que la enfermedad avanza (Gabor y Wiebe, 1997).



Fuente: CABI, 2003

Figura 2.3 Planta de tomate mostrando los síntomas característicos de una infección con *R. solanacearum*.

En el caso de geranios los primeros síntomas de esta enfermedad son una marchitez de las hojas seguida de un amarillamiento de las mismas y por último la planta muere. El espectro de los síntomas también incluye el oscurecimiento de la lámina foliar en forma de “V” (figura 2.4). Las plantas exhiben exudados bacterianos o corrientes de tejidos vasculares a pecíolos, tallos y hojas. *R. solanacearum* raza 3 biovar 2 no causa manchas en la hoja como si las causa una infección con *Xanthomonas campestris* pv *pelargonii* (Whipker, 2003).



Fuente: Whipker, 2003

Figura 2.4 Síntomas de una infección con *R. solanacearum* en plantas de geranio. A. Clorosis y marchitez en hojas. B. Amarillamiento del follaje. C. Clorosis y necrosis en forma de "V". D. Decaimiento de hojas en forma de sombrilla. E. Muerte total de la planta.

En condiciones ambientales es normal que los síntomas aparezcan pocos días después de la infección, sin embargo estos no se expresan cuando las temperaturas son muy bajas (Kim y Olson, 2003).

2.4. Control de la bacteria

El control de esta enfermedad en plantas en crecimiento que se encuentran en suelos infectados es sumamente difícil. La aplicación de productos químicos es casi imposible que funcione para estos casos ya que se ha visto que la fumigación del suelo tiene efectos nulos (Overbeek *et al.*, 2002).

Lo que se recomienda en primer lugar es la prevención, vigilando cuidadosamente el terreno en el que se cultiva y no sembrando el material si se desconoce el estado del suelo. Hay que vigilar el material que se transplanta de una finca a otra y se recomienda manejar una efectiva rotación de cultivos, así como manejar en la medida de lo posible variedades resistentes (APHIS y PPQ, 2004).

Las medidas culturales parecen ser las más efectivas cuando la infección ya aparece en el campo. Los tratamientos de aireación caliente del suelo y aplicaciones de blanqueadores estables dieron resultados positivos en algunos cultivos en Nepal. El uso de sustancias que cambian el pH del suelo es también una medida generalizada entre los agricultores (French, 1994).

El control biológico es un proceso del que no se sabe mucho todavía, sin embargo, varios enemigos naturales se han reportado para esta bacteria. Entre estos están: *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Burkholderia glumae*, *Pseudomonas fluorescens* (French, 1994).

2.5. Genoma de la bacteria

El genoma completo de *R. solanacearum* ha sido recientemente determinado, proveyendo así un punto de arranque para el análisis de los determinantes de patogenicidad (Salanoubat *et al.*, 2002).

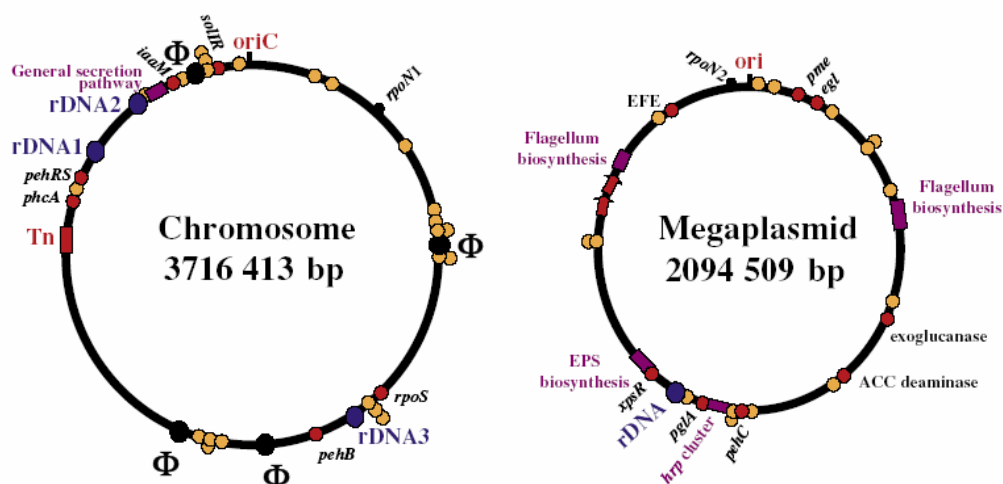
El genoma de *R. solanacearum* presenta una estructura bipartida con un tamaño de 5.8 Mb, con gran contenido de CG (cerca del 67%) y además con el potencial para codificar 5120 proteínas. Este genoma está organizado en dos replicones: un cromosoma de 3.7 Mb y un megaplásmido de 2.1 Mb (figura 2.5) (Stéphane *et al.*, 2000).

El lugar de origen de replicación, así como la distribución de los genes en estos dos replicones comprueba que, el replicón más pequeño es un megaplásmido. Este megaplásmido encierra numerosos genes que pueden jugar un papel importante en las propiedades de la bacteria o que le puede proveer ventajas importantes en diversos ambientes. Por ejemplo, la biosíntesis de flagelo, catabolismo, compuestos aromáticos y resistencia a ciertos minerales como el cobre o el zinc (Tans-Kersten *et al.*, 2001).

Muchas enzimas relacionadas con el metabolismo de moléculas pequeñas se encuentran en el megaplásmido sin una contraparte en el cromosoma. Esta especulación lleva a pensar que el megaplásmido está en el proceso de adquirir nuevas funciones a través de la duplicación o la traslocación de genes esenciales del cromosoma (Stéphane *et al.*, 2000).

Una de los aspectos más interesantes de esta bacteria es la complejidad y el potencial de plasticidad. Esto está ilustrado por medio de elementos transponibles y por la presencia de regiones alternativas de codones en uso (ACURs) los cuales corresponden a aproximadamente al 7% del genoma total. Estas regiones se dice que cumplen diversas funciones y están presentes en la mayoría de las formas intraespecíficas que presenta este patógeno (Kim y Olson, 2003).

Dentro de todo el genoma de *R. solanacearum* se encuentran genes que codifican para ciertas proteínas envueltas en la patogenicidad, entre los más importantes están los genes *hpr*. Muchos de estos genes varían de una raza a otra o de un biovar a otro, por lo que se usan para la determinación o clasificación de las formas intraespecíficas de esta bacteria (Janse *et al.*, 2004).



Fuente: Stéphane *et al.*, 2000

Figura 2.5 Distribución de los genes en el genoma completo de *R. solanacearum*

Recientemente se ha secuenciado todo el genoma de la cepa GMI 1000, obteniendo un total de 3 716 413 pares de bases. Todo el material se encuentra disponible en el Genbank, por lo que se convierte en una herramienta muy importante para futuros estudios (Salanoubat *et al.*, 2002).

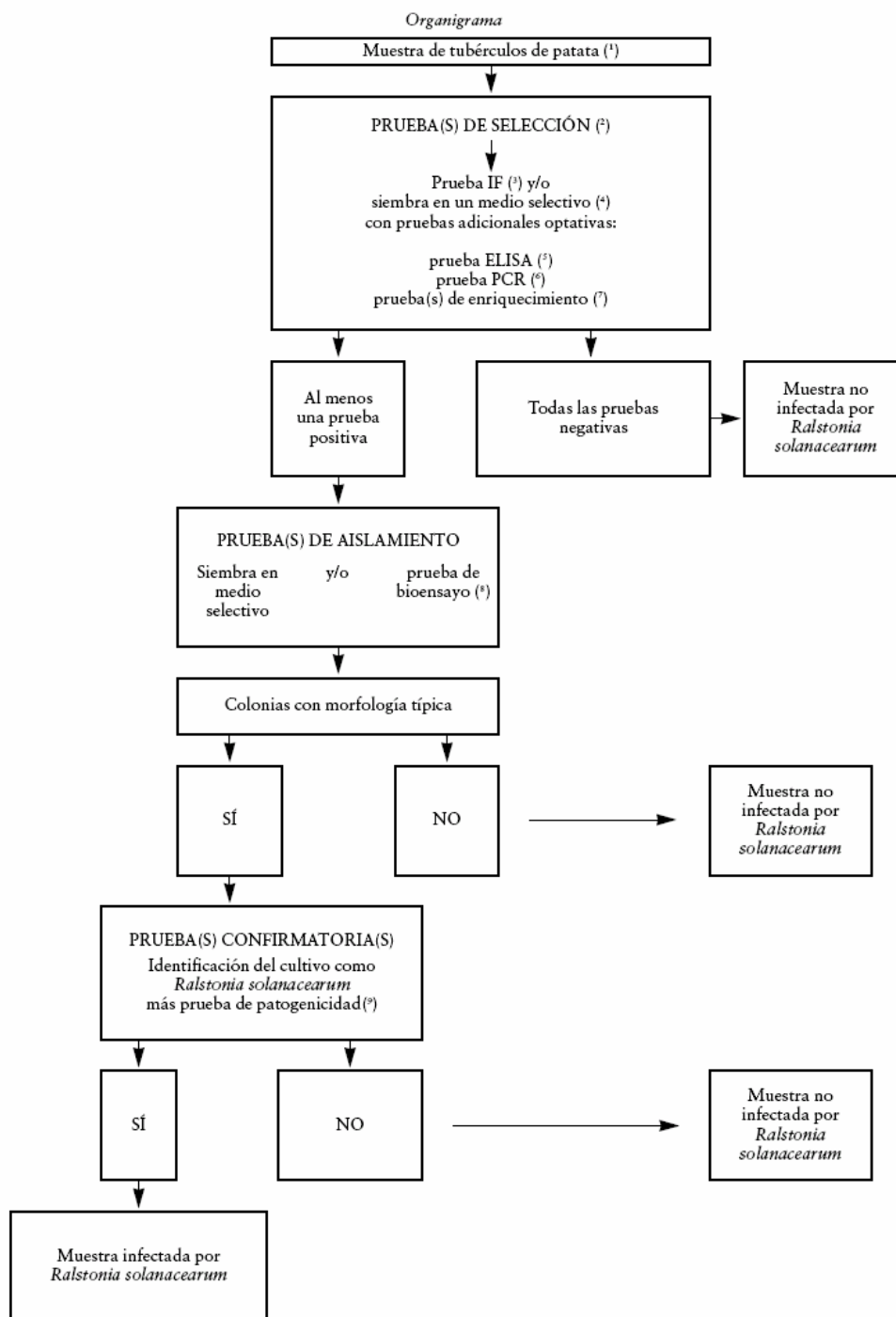
2.6. Detección y diagnóstico

Esta es una de las etapas más críticas cuando se estudia un problema fitopatológico ya que se debe comprobar la identidad del microorganismo que está causando el daño (Directiva del Consejo UE, 1998).

En el diagnóstico de este microorganismo se pueden seguir cinco etapas básicas aunque a veces, algunas se pueden omitir. El primer paso es ir al campo, realizar un muestreo y observar detalladamente los síntomas presentes, tomando nota de todos los pormenores que tienen que ver con el ambiente y las condiciones sobre las cuales está creciendo la planta afectada. El material se debe trasladar al laboratorio para efectuarle un diagnóstico más preciso, teniendo el cuidado de que este transporte no vaya a afectar la condición de la planta (Directiva del Consejo UE, 1998).

En una segunda etapa en el laboratorio o a veces en el campo se llevan a cabo pruebas de selección rápidas que permiten discriminar entre enfermedades que podrían presentar síntomas similares. Una tercera etapa que no siempre se hace, es el aislamiento en medio de cultivo selectivo. Por último, se enumeran dos etapas finales, las pruebas de confirmación que son las que brindan la identificación más precisa y las pruebas de patogenicidad que son pruebas alternativas para asegurar el diagnóstico (APHIS y PPQ, 2004).

En la figura 2.6 se muestra un esquema que se debe seguir para llevar a cabo un diagnóstico de *R. solanacearum* en papa y que rige oficialmente para la exportación e importación a la Unión Europea. De manera que de forma similar se puede usar el protocolo para el diagnóstico de *R. Solanacearum* raza 3 biovar 2 en geranios (Directiva del Consejo UE, 1998).



Fuente: Directiva del Consejo UE, 1998.

Figura 2.6 Esquema a seguir para hacer un diagnóstico de *R. solanacearum* en papa.

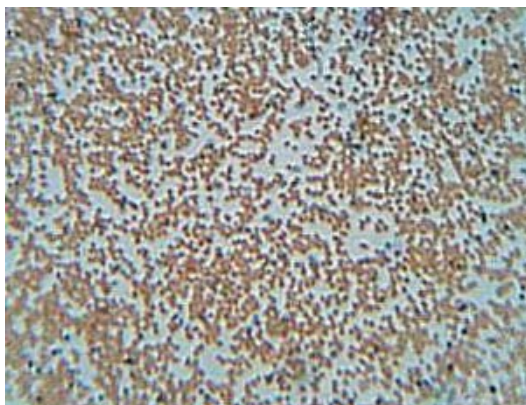
2.6.1. Las pruebas de selección rápida

Estas pruebas facilitan un diagnóstico de presunción. Se recomienda comúnmente llevar a cabo más de una prueba para tener mayor certeza del diagnóstico en la etapas siguientes (Directiva del Consejo UE, 1998.).

Una de las pruebas más utilizadas en el caso de esta bacteria es la prueba de exudación del tallo, en donde la presencia de *R. solanacearum* en tallos de plantas marchitos se pueden evaluar al cortar el tallo por encima del nivel del suelo, este tallo se coloca en un recipiente que contenga agua destilada. Poco después, de los haces vasculares saldrán espontáneamente hilos de flujo bacteriano. Este fenómeno no se producirá con ninguna otra bacteria que cause infecciones vasculares en las plantas de papa, de tomate, o geranio (Jones *et al.*, 1991).

Otra prueba de selección rápida incluye la observación del microorganismo como tal, tomado directamente de la planta infectada, en un microscopio. Donde se debe observar la morfología del microorganismo así como su motilidad (Elphistone *et al.*, 1996).

Esta prueba puede enriquecer su funcionalidad con la utilización de colorantes para una observación más detallada. La detección de gránulos de poli- β -hidroxibutirato (PHB) propios de las células de *R. solanacearum* se visualizan tiñendo con azul Nilo A o negro Sudán B (figura 2.7). Otra tinción muy común es la tinción de Gram (Duarte, 2005).



Fuente: Duarte, 2005

Figura 2.7 Tinción de los gránulos PHB de *R. solanacearum* con negro Sudán. Los puntos negros representan los gránulos.

Por último los “test” o pruebas rápidas comerciales también son muy utilizadas, estas pruebas se basan en la detección inmunológica de la bacteria. Dos de estas pruebas son: CSL Pocket Diagnostics® y ACL-Rs Inmunostrips® (anexo 5).

2.6.2. Aislamiento en medio de cultivo selectivo

En ciertas ocasiones es difícil identificar el agente causal de una enfermedad cuando se encuentra dentro del tejido vegetal, por lo tanto se hace necesario el aislamiento del microorganismo en un medio de cultivo donde se pueda analizar en forma pura y en mayores cantidades (EPPO, 2003).

R. solanacearum es una bacteria que se multiplica rápidamente en sus hospederos, pero su crecimiento *in vitro* es mucho más lento que el de muchos otros microorganismos patógenos y saprófitos. Además su tasa de mutación a cepas avirulentas puede ser muy alta y en un corto tiempo. La forma más recomendada para su almacenamiento es en agua destilada a temperatura ambiente o a bajas temperaturas no menores a 4° C (Horita, 2001).

Los métodos de aislamiento son muy variados y van desde usar trozos del tejido hasta suelo en diluciones acuosas. El método más recomendado es el que toma parte del exudado bacteriano y lo inocula en una placa. También se suele usar parte del tejido afectado macerado para su siembra en los diferentes medios de cultivo (Jones *et al.*, 1991).

En cuanto a los medios de cultivo usados para el aislamiento de este microorganismo, están los medios genéricos que son los menos recomendados; entre estos el Agar Nutritivo (NA), que es un medio muy general en el cual pueden crecer muchos otros microorganismo (Stead, 1992a).

Luego están los medios selectivos como YPGA, SPA, YDC y King B, que sin embargo, no son tan específicos para *R. solanacearum*, de manera que se pueden usar como medio para aislamiento siempre y cuando la muestra no esté tan contaminada. En este caso son considerados medios semiselectivos. Cabe destacar que en el medio King B la bacteria no es fluorescente (Directiva del consejo UE, 1998).

En un medio nutritivo general, los aislados virulentos (capaces de provocar enfermedad) de *R. solanacearum* desarrollan colonias de color blanco nacarado, planas, irregulares y fluidas, que con frecuencia presentan los verticilos característicos (Stead, 1992a).

Por último, se tienen los medios selectivos, entre estos están: Agar TZC (Medio Tetrazolio de Kelman) y SMSA. Éstos son los más recomendados para el aislamiento de *R. solanacearum*, porque son muy específicos e incluso con algunas modificaciones, que podrían incluir la adición de antibióticos, permiten el crecimiento únicamente de esta bacteria. Además los medios se podrían usar para la caracterización de la raza y el biovar con que se cuenta (Directiva del consejo UE, 1998).

En el medio de TZC, las colonias típicas de aislados virulentos de *R. solanacearum* son de color crema, planas, irregulares, con anillos de color rojo sangre en el centro. Las colonias avirulentas de *R. solanacearum* son butirosas y de color rojo fuerte (figura 2.8) (Anon, 1997).

En el medio SMSA, las colonias típicas de los aislados virulentos de *R. solanacearum* son de color blanco lechoso, planas, irregulares y fluidas, y presentan centros de un marcado color rojo sangre. Las formas avirulentas de *R. solanacearum* desarrollan colonias menos fluidas, cuyo color oscila entre completamente rosa y rojo en el medio SMSA (Engelbrecht, 1994).



Fuente: Salanoubat, 2002.

Figura 2.8. Aislamiento de *R. solanacearum* en medio TZC

2.6.3. Pruebas de confirmación

Dentro de un diagnóstico científico de una enfermedad las pruebas de confirmación son las que llevan el peso de las conclusiones que se puedan tomar en torno al cultivo afectado. Son las más sensibles y eficaces por lo que se debe tener mucho cuidado al llevarlas a cabo y no cometer errores durante su interpretación. Para identificar con exactitud los cultivos puros o muestras vegetales infectados con *R. solanacearum* se recomienda al igual que en las pruebas presuntivas llevar a cabo al menos dos pruebas de confirmación (Duveiller *et al.*, 2001).

Los métodos más tradicionales usados por la microbiología para la identificación de un microorganismo y su caracterización, son todos aquellos basados en la propiedades bioquímicas, nutricionales y enzimáticas del microorganismo. Las propiedades fenotípicas de *R. solanacearum* se detallan en la figura 2.9 (Directiva del consejo UE, 1998).

Pigmento fluorescente	-
Inclusiones de PHB	+
Prueba O/F	O +/F -
Catalasa	+
Oxidasa de Kovacs	+
Reducción de nitratos	+
<hr/>	
Utilización de citrato	+
Crecimiento a 40 °C	-
<hr/>	
Crecimiento en NaCl al 1 %	+
Crecimiento en NaCl al 2 %	-
Dihidrolasa de arginina	-
Licuación de gelatina	-
Hidrólisis del almidón	-
Hidrólisis de la esculina	-
Producción de levano	-

Fuente: Directiva del Consejo UE, 1998.

Figura 2.9 Perfil bioquímico de *R. solanacearum* usado para su identificación.

Estos métodos sólo se utilizan en cultivos puros bacterianos y las comparaciones entre los diferentes cultivos se deben hacer cuando los cultivos son jóvenes, preferiblemente de 24-48 horas. Existen pruebas donde es necesario tener un valor cuantitativo para poder discriminar, en estos casos es de vital importancia tener un control positivo para poder llevar a cabo la prueba. Aunque estas pruebas suelen ser tediosas y laboriosas, cuando son bien ejecutadas su resultado es bastante confiable (Elphinstone *et al.*, 1996).

Entre las pruebas más utilizadas está la oxidasa de Kovacs, en la cual cuando se coloca una fracción de la colonia en un papel filtro adecuado se observa una coloración azul, cuando la reacción sea positiva.

Otras son, la adecuación de la prueba de Gram usando KOH, donde sin llevar a cabo la tinción se pueden determinar las características de la pared celular del microorganismo. Menos comunes están las pruebas de reducción del nitrato, producción de ácido y producción de levano (Duveiller *et al*, 2001).

Las pruebas serológicas e inmunológicas también se consideran pruebas de confirmación. Estas técnicas ofrecen en la actualidad una alternativa fácil y sensible para la detección de este fitopatógeno en plantas, incluso en la actualidad se desarrollan mecanismos para llevar a cabo la detección en el suelo y el agua, y además se pretende concretar mecanismos para la detección de razas y biovares específicos (French *et al*, 1995).

Dentro de estas técnicas la prueba IF o Inmunofluorescencia actúa mediante una hibridación inmunológica entre el microorganismo y un antisuero específico, que al ser observada en un microscopio de fluorescencia muestra una coloración característica. Otra prueba válida pero menos usada es la aglutinación, en la cual por medio de un antisuero específico se determina la presencia de la bacteria; así como la inmunocaptura que permite aislar el microorganismo de diferentes sustratos (French *et al.*, 1995).

La última y más usada de estas técnicas es la prueba de Inmunoabsorción Enzimática (ELISA por sus siglas en inglés). Este ensayo es muy común para detectar varios microorganismo, incluso virus. Consiste en la unión de antígenos solubles provenientes de las células bacterianas a una placa de microtitulación, seguido de una reacción específica con un anticuerpo específico, el cual está marcado, esto permite que la presencia bacteriana se pueda visualizar por diversos medios, entre ellos la aparición de un color específico (Robinson *et al.*, 1995).

Para terminar con las pruebas de confirmación, hay que hablar de una categoría de técnicas que aparte de ser las más nuevas y estudiadas en la actualidad, son las de mayor sensibilidad y confiabilidad. Razón por la cual se podría pensar que estas son las técnicas que se usarán en el futuro para el diagnóstico de prácticamente todas las plagas y enfermedades. Estas son las técnicas moleculares (French *et al.*, 1995).

Las pruebas moleculares son muy variadas, entre estas se encuentran las que se basan en moléculas de grasas (las menos usadas), pasando por la comparación de perfiles proteicos y hasta llegar a las más famosas que utilizan ácidos nucleicos (ADN y ARN principalmente) (USDA *et al.*, 2004).

El estudio de perfiles de ácidos grasos (Fatty acid profiling o FAP), es una de estas pruebas, en donde se compara el perfil de la muestra con el de un control. En condiciones específicas, los ácidos grasos característicos para *R. solanacearum* son 14:0 3OH, 16:0 2OH, 16:1 2OH y 18:1 2OH (Stead, 1992b).

Los perfiles de proteínas se estudian de dos formas. En el primer caso las proteínas desnaturalizadas de células enteras se separan mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE). Y el otro método consiste en usar proteínas en su estado nativo sin ser desnaturalizadas. Ambos métodos pueden ser efectivos, aunque no se reportan muchos estudios en los que utilicen para la caracterización de esta bacteria (Anon, 1997).

Las técnicas de mayor trascendencia en la actualidad son las que se basan en el uso de ADN y ARN específicos, para determinar la presencia de la bacteria y para llevar a cabo su caracterización (French *et al.*, 1995). Como el presente estudio tiene como objetivo principal el uso de una de estas técnicas se estará hablando de ellas en un apartado más adelante.

2.6.4. Pruebas de patogenicidad.

El final de un proceso de diagnóstico puede ser el estudio de los postulados de Koch con el microorganismo y el hospedero que se está analizando y se usa únicamente para confirmar el diagnóstico y para los casos en los que sea necesario determinar si los síntomas se presentan en otros hospederos (Willianson *et al.*, 2002).

2.7. Métodos de detección y caracterización basados en la presencia de ácidos nucleicos específicos del patógeno.

Estos métodos se podrían dividir en tres tipos. Las técnicas que se utilizan en la caracterización molecular de diferentes cepas, para las cuales es necesario usar cultivos puros. Las técnicas que se usan para la detección y diagnóstico de la bacteria, que se pueden ser llevar a cabo a partir de cultivos bacterianos o de sustratos naturales en los que se encuentra la bacteria. Por último están los métodos que permiten tanto la detección, como la caracterización a partir de cualquier sustrato, lo cual se convierte en el ideal de técnica para este caso (Wilson, 1997).

2.7.1. Técnicas de Hibridación

La propiedad de renaturalización que tienen las cadenas sencillas complementarias de los ácidos nucleicos es la base para una poderosa herramienta genética analítica y para el diagnóstico molecular. La hibridación molecular es una técnica que debe su nombre al hecho de que, para la renaturalización de cadenas sencillas, no es necesario que éstas provengan de una misma fuente de ácidos nucleicos. Basta con que las cadenas sean complementarias para que se formen híbridos moleculares. Incluso a bajas temperaturas sería posible una hibridación entre ADN y ARN (Klug y Cummings, 1999).

En la década de los 60, las técnicas de hibridación molecular contribuyeron a aumentar el conocimiento de los fenómenos transcripcionales que ocurren a nivel de los genes. Poco a poco la técnica se ha refinado hasta llegar a convertirse en una gran herramienta para la biología molecular en general y para el diagnóstico molecular en especial, sobre todo con las técnicas de hibridación *in situ* (Overbeek *et al.*, 2002).

En este caso se fijan células bajo ciertas condiciones especiales de hibridación y se añade ADN de cadena simple marcado radiactivamente, luego se detecta la hibridación por medio de un revelado. El ácido nucleico sirve de sonda, ya que sólo hibridará con las áreas específicas del cromosoma para las que es complementario (Klug y Cummings, 1999).

En la actualidad las sondas fluorescentes son de gran utilidad. Estas sondas se preparan de distinta forma; cuando se utiliza ADN, éste se une a una molécula orgánica pequeña llamada biotina. Una vez que se ha llevado a cabo la hibridación *in situ*, se utiliza otra molécula que tiene gran afinidad para unirse a la biotina, la cual a su vez va unida a una molécula fluorescente que hace posible su visualización. Éste método es extremadamente sensible para la localización de ADN específico y se conoce como hibridación *in situ* fluorescente o FISH por sus iniciales en inglés (Klug y Cummings, 1999).

Overbeek *et al.* (2001) utilizaron este principio para llevar a cabo la detección de células de *R. solanacearum* o sus microcolonias en habitats naturales usando la hibridación *in situ* de nucleótidos del ARN ribosomal 16S. Además se desarrollaron dos sondas que detectan específicamente el ARN ribosomal 23S de esta bacteria. Estas sondas son RSOLA y RSOLB, y es esta última la que permite una cuantificación de las poblaciones bacterianas cuando se usa con fluorescencia.

Otros métodos de hibridación han sido desarrollados para la detección de esta bacteria. Por ejemplo Seal *et al.* (1992) desarrollaron una sonda (P52096), que permite su identificación al hacer pasar por una membrana de nitrocelulosa o nylon, que contiene la sonda marcada, una purificación de ADN de la planta infectada. Luego del lavado, la sonda es detectada por colorimetría permitiendo de esta forma discriminar entre las purificaciones que contienen ADN de la bacteria y las que no.

Las técnicas de hibridación también se pueden usar en conjunto con otras técnicas moleculares para llevar a cabo un diagnóstico más sensible. Como es el caso del *Southern Blot* (Hibridación Southern), aquí, el ADN clonado se corta en fragmentos y los fragmentos son separados en un gel. El ADN se desnaturaliza dentro del gel en fragmentos de cadena sencilla y éstos se transfieren a un filtro que contiene la sonda, lo que permitirá que ocurra la hibridación. Luego se hace un revelado y los resultados pueden ser leídos.

Lee y Wang, (2000) usaron una secuencia amplificada por medio de RAPD como sonda en una transferencia Southern y lograron detectar exitosamente la bacteria. Por otro lado Schönfeld *et al.* (2003) desarrollaron una sonda a partir de la amplificación del gen *fliC* la cual elevó en gran medida la sensibilidad de la prueba para la detección.

2.7.2. Técnicas de PCR-RFLP

Los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP por sus siglas en inglés) se utilizan como marcadores moleculares para detectar diferencias mínimas, incluso de hasta unas pocas bases, entre los genomas de organismos diferentes o muy relacionados (Cook y Sequeira, 1994).

Entre todos los organismos existen variaciones de origen en las secuencias nucleotídicas, principalmente en las regiones no codificantes. Estas variaciones aleatorias pueden formar o destruir sitios de reconocimientos de las enzimas de restricción, alterando el patrón de cortes que las enzimas producen en el ADN (Klug y Cummings, 1999).

Cuando este estudio se combina con la técnica de PCR, permite diferenciar entre especies o incluso entre cepas del organismo a nivel intraespecífico, como el caso de los biovares. Lo que se hace es llevar a cabo una amplificación de una región variable del genoma con el uso de imprimadores que flanquean esta región. El segmento amplificado tendrá diferencias en el patrón de cortes de diferentes enzimas de restricción produciendo segmentos de diferentes tamaños, que al migrar en un gel podrán ser observados a diferentes alturas permitiendo así la diferenciación de las cepas (Poussier *et al.*, 2000b).

Estas variaciones se heredan de forma mendeliana como alelos codominantes, lo cual permite seguir la herencia de cromosomas específicos de generación en generación. Los RFLP se distribuyen por todo el genoma, están en regiones intergénicas y dentro de genes, se encuentran en las regiones reguladoras adyacentes a unidades transcripcionales, adyacentes a genes y dentro de intrones y de exones (Klug y Cummings, 1999).

Esta técnica se ha usado mucho en el diagnóstico y caracterización de *R. solanacearum*, sobre todo en estudios de caracterización molecular de las diferentes cepas (Roncal *et al.*, 1999).

Por ejemplo, Roncal *et al.* (1999) lograron establecer un patrón de RFLP para la diferenciación de cepas de *R. solanacearum* por medio de la amplificación con los imprimadores P759 y P760 seguido por la digestión con las enzimas *HaeIII* y *MspI*. Ellos dividieron las cepas en dos grupos principales, separando las cepas de los biovares 3 y 4, de las que presentaban los biovares 1 y 2. Además lograron establecer diferencias entre las cepas provenientes de Asia y Australia de las provenientes de América (Roncal *et al.*, 1999).

Además Poussier *et al.* (2000b) llevaron a cabo un estudio de PCR-RFLP de una región del gen *hrp* pudiendo diferenciar entre *R. solanacearum* y otras bacterias muy relacionadas.

2.7.3. Técnicas de Rep-PCR

Esta técnica al igual que la anterior es muy usada para la caracterización de las diferentes razas y biovares de esta bacteria.

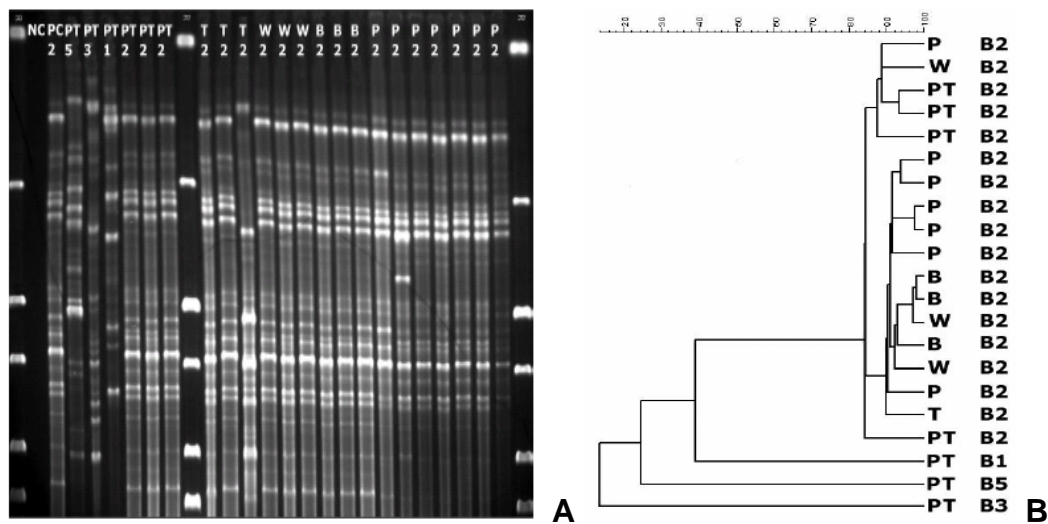
La huella genómica obtenida por REP-PCR utiliza iniciadores de ADN complementarios a las secuencias repetitivas y altamente conservadas encontradas en múltiples copias en los genomas de la mayor parte de las bacterias gram positivas (Janse *et al.*, 2004).

Se han identificado tres familias de secuencias repetitivas, incluida una secuencia repetitiva extragénica palindrómica (REP) de 35-40 pb, la secuencia consenso enterobacteriana repetitiva intergénica (ERIC) de 124-127 pb y el elemento BOX de 154 pb. Estas secuencias parecen estar localizadas en diferentes posiciones intergénicas en el cromosoma. Los elementos repetitivos pueden presentarse en ambas orientaciones, por lo que los iniciadores han sido diseñados para cebar la síntesis de ADN de la repeticiones invertidas en REP y ERIC, y la subunidad boxA en BOX. El uso de estos iniciadores y la PCR permite una amplificación selectiva de diferentes regiones genómicas localizadas entre REP, ERIC, o elementos BOX (Horita *et al.*, 2001).

Los fragmentos amplificados se pueden resolver en un gel, produciéndose un patrón conocido como huella genómica REP-PCR. Estas huellas se parecen a un código de barras. Las huellas genómicas generadas de aislamientos bacterianos permiten la identificación de las especies, subespecies y cepas (Horita *et al.*, 2000).

Janse *et al.* (2004) utilizaron esta técnica para caracterizar una serie de cepas de *R. solanacearum* que fueron aisladas de plantas de geranio y determinar las características a nivel genético por medio de una comparación de la huella genómica mostrada, en comparación con cepas de colecciones internacionales (figura 2.10).

Ellos lograron establecer que los aislados de geranio correspondían con las cepas de biovar 2, determinando además una huella genómica para los otros biovares y determinando la diferencia en cuanto a distancia genética entre los diferentes biovares (Janse *et al.*, 2004).



Fuente: Janse *et al.*, 2004

Figura 2.10 Huella genómica de Rep-PCR de diferentes cepas bacterianas de *R. solanacearum*. A. Electroforesis, en la parte superior del gel se muestra con un número el biovar de cada cepa, los que se simbolizan con una P fueron aislados de geranio. B. Dendograma derivado de la electroforesis mostrando las distancias génicas entre los biovares.

2.7.4. La técnica de PCR con imprimadores específicos

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) es la técnica de diagnóstico molecular por excelencia. La PCR permite la amplificación directa de segmentos de ADN específicos en grandes cantidades a partir de cantidades extremadamente pequeñas (Klug y Cummings, 1999).

El método se basa en la elongación de un segmento de ADN llevado a cabo por la ADN polimerasa. La universalmente usada es la *Taq* ADN polimerasa una enzima aislada de *Thermus aquaticus* que tiene la propiedad de soportar altas temperaturas sin llegar a su desnaturalización (Klug y Cummings, 1999).

Esta enzima empieza a llevar a cabo su función cuando encuentra un imprimador o cebador unido a la cadena de ADN molde. Los imprimadores son oligonucleótidos que hibridan con la cadena complementaria en las regiones del ADN que flanquean la secuencia que se quiere amplificar.

La reacción requiere de tres pasos fundamentales. En el primer paso el ADN se desnaturaliza en cadenas sencillas por medio de calor por lo general a una temperatura que ronda los 94° C. En un segundo paso los imprimadores hibridan con el ADN simple banda, por lo general se usan dos imprimadores diferentes, cada uno de ellos tiene la secuencia complementaria a una de las dos cadenas del ADN. La temperatura a la cual los imprimadores hibridan varía dependiendo de varios factores, como: la longitud de los imprimadores, el porcentaje de GC de los imprimadores, la variante de la técnica usada y la especificidad del resultado deseado (Wilson, 1997).

El tercer paso de la reacción se da cuando la *Taq* polimerasa se une al imprimador y empieza a extender la cadena en dirección 5' - 3' utilizando como molde la cadena sencilla unida al imprimador. El producto es una molécula de ADN de doble banda que incluye los imprimadores (Wilson, 1997).

Cada grupo de tres pasos se denomina ciclo, el cual se repite una y otra vez, duplicando en cada ciclo la cantidad de moléculas hasta obtener enormes cantidades de ADN. Veinticinco ciclos amplifican varios millones de veces el ADN de interés. Todo el proceso se lleva a cabo en un termociclador, el cual se puede programar para realizar un número predeterminado de ciclos (Klug y Cummings, 1999).

R. solanacearum es una bacteria muy estudiada a nivel molecular lo cual ha permitido el desarrollo de muchos protocolos de PCR. En cuanto a la especie muchos protocolos y diferentes oligonucleótidos específicos, de las regiones 16S y 23S del ARNr principalmente, han sido descritos para su diagnóstico e identificación. (Klug y Cummings, 1999)

Seal *et al.* (1992) desarrollaron los imprimadores PS96-H/PS96-I y los imprimadores OLI-1/Y-2 (1993); ambos pares de imprimadores específicos para *R. solanacearum*. Los segundos han sido probados por muchos autores mostrando resultados positivos, ya que han permitido llevar a cabo la identificación de la bacteria en diversos sustratos como suelo, agua, y material vegetal como semillas y plantas.

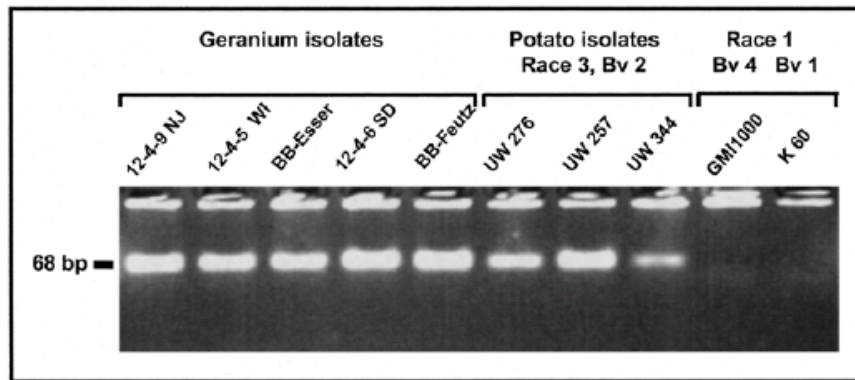
Los imprimadores OLI-1 y Y-2 son complementarios a una zona del genoma de la bacteria que es única para ella y flanquean un fragmento de 288 pares de bases de la región 16S del ARNr. Por lo que en un gel únicamente las muestras que presenten la bacteria mostrarán la banda de 288 bp (anexo 2) (Seal *et al.*, 1992).

Existen otros imprimadores que han sido desarrollados para la detección específica de esta bacteria. Opina *et al.* (1997) desarrollaron los imprimadores P759 y P760 para una amplificación específica de esta bacteria. Además Boudazin *et al.* (1999) probaron los imprimadores OLI-2 y Z, los cuales mostraron alta especificidad para detectar la presencia del microorganismo en estudio. Además la amplificación del fragmento *fliC* también es una alternativa para la detección específica de la bacteria.

Caruso *et al.* (2003) desarrollaron un método de alta sensibilidad para la detección de *R. solanacearum* en agua por medio de PCR. Ellos utilizaron la técnica conocida como Co-PCR con mezclas de los siguientes imprimadores: OLI-1, OLI-2, Y-2, Z, y JE-2, en donde los imprimadores OLI-2, Y-2, Z y JE-2 actúan en dirección reversa al imprimador OLI-1 que es el más específico, lo cual da como consecuencia un efecto anidado que brinda mayor sensibilidad y especificidad.

El PCR anidado ha sido otra de las técnicas usadas en el diagnóstico molecular de esta enfermedad. Poussier *et al.* (2000a) implementaron un PCR anidado en el que usaron los imprimadores RS30-RS31 seguidos por los imprimadores RS30a-RS31a y RS30b-RS31b. Mostrando una sensibilidad capaz de detectar una concentración de 10^2 cfu/ml.

Otros protocolos de PCR han ido más profundamente que el nivel de especie. Por ejemplo, Swanson *et al.* (2005) probaron los imprimadores 630/631 como un método para amplificación específica de ADN de *R. solanacearum* raza 3. Por otro lado, Willianson *et al.* (2002) mediante una modificación del protocolo desarrollado por Weller *et al.* (2000) lograron determinar la presencia del biovar 2 de *R. solanacearum* usando los imprimadores B2-I-F y B2-II-R. Estos imprimadores también están diseñados para la región específica ARNr 16S de este fitopatógeno, y producen un fragmento de 68 pares de bases, que no fue encontrado en los otros biovares (figura 2.11).



Fuente: Willianson *et al.*, 2002

Figura 2.11 Electroforesis de la PCR de diferentes cepas de *R. solanacearum* usando los imprimadores B2-I-F y B2-II-R. Obsérvese que sólo las de biovar 2 presentan la banda de 68 bp.

El PCR en tiempo real es la técnica que presenta las mayores ventajas en cuanto a sensibilidad, especificidad y rapidez se refiere. Es una técnica muy nueva y su superioridad con respecto a los otros métodos es que no hace falta la electroforesis para obtener los resultados y además de que permite la cuantificación del producto obtenido (Weller *et al.*, 2000).

Precisamente Weller *et al.* (2000) puso en práctica este método con el objetivo de detectar la bacteria en plantas de papa infectadas. Para esto utilizó los imprimadores RS-I-F y RS-II-R que flanquean una región del ARNr 16S donde se une la sonda RS-P, estos permiten la detección y cuantificación a nivel de especie.

Para la detección a nivel de biovar 2, utilizaron los imprimadores B2-I-F y B2-II-R que también flanquean una región perteneciente a los genes ribosomales a la cual se une la sonda B2-P. A manera de control usaron los imprimadores COX que amplifican una región específica del gen citocromo oxidasa específico para papa. A esta región se une la sonda COX-P la cual permite su detección y cuantificación (Weller *et al.*, 2000).

3. IMPORTANCIA Y JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

El proyecto a desarrollar nace a raíz de la necesidad que tiene el Servicio Fitosanitario del Estado, por desarrollar un protocolo que pueda detectar eficientemente la bacteria *R. solanacearum* en muestras vegetales de geranio. Las muestras se deben certificar libres de *R. solanacearum* raza 3 biovar 2; esto debido a que las plantas de geranio son exportadas a los Estados Unidos y en este país esta raza y biovar no están reportados, por lo que se convertiría en un problema cuarentenario y su ingreso es prohibido.

El uso de la técnica de PCR para lograr tal objetivo se fundamenta por varios factores. En primer lugar para aplicar esta técnica no es necesario usar toda la planta como muestra, basta con tomar una hoja. Esto representa una gran ventaja porque muchas veces el material es muy valioso y no puede ser usado en su totalidad.

Además la técnica de PCR garantiza una alta sensibilidad y especificidad. Ya que con pequeñas cantidades de ADN se puede detectar la presencia de la bacteria, cosa que no se logra con métodos más tradicionales. La especificidad viene dada por el uso de imprimadores específicos. Se logra conocer si está presente la especie discriminado de esta forma infecciones por otro microorganismo. Si se determina que la bacteria está presente, una segunda reacción demostrará si pertenece o no al biovar 2.

También hay que tomar en cuenta la facilidad en cuanto a recursos que demanda la técnica así como la relativa rapidez con que se puede dar un diagnóstico en relación con otras técnicas. De manera que este trabajo vendría a coadyuvar con la labor del Ministerio de Agricultura y Ganadería.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

- Establecer un protocolo para la detección eficiente y específica de *R. solanacearum* raza 3 biovar 2 en muestras vegetales usando para ello la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

4.2. Objetivos Específicos

- Ubicar y muestrear plantas de diferentes hospederos principalmente de geranio, que presenten síntomas característicos de la enfermedad.
- Encontrar material de referencia tanto para las pruebas preliminares como para las pruebas moleculares.
- Establecer un protocolo a seguir para realizar un diagnóstico previo y preliminar de la enfermedad.
- Determinar posibles medios de cultivo, condiciones de crecimiento y metodología para el aislamiento y purificación de la bacteria.
- Llevar a cabo el aislamiento de ADN de alta calidad a partir de tejido vegetal y de cultivo bacteriano, de tal forma que permita una efectiva amplificación.
- Determinar la presencia de la bacteria *R. solanacearum* a nivel de especie por medio de PCR.
- Discriminar entre infecciones de otros biovars y una infección de *R. solanacearum* raza 3 biovar 2; por medio de PCR.
- Establecer la relación entre síntomas, pruebas preliminares y resultados de las pruebas moleculares.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente proyecto se realizó en las instalaciones del Programa de Diagnóstico Fitosanitario del Servicio Fitosanitario del Estado, del MAG. Este laboratorio se encuentra ubicado en el Aeropuerto Juan Santamaría, Alajuela, Costa Rica. El proyecto se ejecutó entre los meses de julio y diciembre del año 2005.

Se dividió en tres componentes principales: la búsqueda y muestreo de plantas infectadas, la realización de pruebas preliminares y finalmente el diagnóstico molecular.

Los muestreos de plantas infectadas se realizaron en fincas agrícolas nacionales, mientras que las pruebas preliminares se llevaron a cabo en el área de Fitopatología. Las pruebas y análisis moleculares se ejecutaron en el área de Biología Molecular de dicho Programa.

5.1. Descripción del material utilizado

5.1.1. Material de campo

Se llevaron a cabo muestreos en diferentes zonas del país, basándose en los síntomas reportados por la literatura, principalmente en la zona central del país. Se muestrearon únicamente plantas de dos especies que son atacadas por la bacteria: geranio (*Pelargonium sp*) y tomate (*Lycopersicum esculentum*).

Para el caso de las plantas de geranio se visitó un vivero comercial en la zona de Agua Caliente de Cartago, en el cual se evaluaron visualmente plantas de geranio producidas en este lugar. Las plantas se encontraban a campo abierto bajo condiciones de temperatura y humedad ambientales. Presentaban un desarrollo avanzado de crecimiento, encontrándose en bolsas plásticas en etapa de floración.

Así mismo se encontraban bajo un régimen de riego diario normalizado y aplicaciones de funguicidas que no se detallaron. De éste vivero se tomaron cuatro plantas (repeticiones) que fueron llevadas al laboratorio para su posterior análisis. En el laboratorio las plantas fueron rotuladas debidamente (cuadro 5.1) y analizadas en cuanto a los daños y los síntomas característicos que presentaban. Las plantas fueron mantenidas bajo condiciones ambientales y un régimen de riego diario.

Para el cultivo de tomate se llevaron a cabo muestreos en dos zonas agrícolas del país. El primero se efectuó en una finca de Yas de Cartago, aquí se analizaron las plantas visualmente con el fin de determinar la posibilidad de presencia de la bacteria. Luego se tomaron las plantas enteras con síntomas más evidentes y fueron trasladadas al laboratorio para un análisis más detallado.

Para el segundo muestreo se visitaron dos fincas productoras de tomate en Sarchí de Alajuela. En la primer finca sembrada con la variedad montaña fresca, las plantas se encontraban sembradas en hileras en un estado avanzado del ciclo del cultivo. Las condiciones ambientales consistían en bastante humedad y según la afirmación del propietario de la finca se habían llevado a cabo aplicaciones de fertilizantes y funguicidas que no fueron detallados.

De esta finca se procedió a sacar cuatro plantas enteras (repeticiones), incluyendo parte del suelo en el que se encontraban y fueron trasladadas al laboratorio para ser analizadas con mayor profundidad.

La segunda finca, se encontraba bajo condiciones ambientales muy similares a las encontradas en la finca anterior, con una gran humedad. En esta finca se tomaron de igual manera cuatro plantas (repeticiones) con los síntomas más representativos de la enfermedad y fueron trasladadas al laboratorio para su posterior análisis.

Cuadro 5.1 Material vegetal de especies afectadas usado en el estudio.

Código muestra	Hospedero	Origen
Ge-01	Geranio	Agua Caliente, Cartago
Ge-02	Geranio	Agua Caliente, Cartago
Ge-03	Geranio	Agua Caliente, Cartago
Ge-04	Geranio	Agua Caliente, Cartago
Tc-01	Tomate	Yas, Cartago
Tc-02	Tomate	Yas, Cartago
Tc-03	Tomate	Yas, Cartago
Tc-04	Tomate	Yas, Cartago
Ts-01	Tomate	Sarchí, Alajuela (finca 1)
Ts-02	Tomate	Sarchí, Alajuela (finca 1)
Ts-03	Tomate	Sarchí, Alajuela (finca 1)
Ts-04	Tomate	Sarchí, Alajuela (finca 1)
Ts-05	Tomate	Sarchí, Alajuela (finca 2)
Ts-06	Tomate	Sarchí, Alajuela (finca 2)
Ts-07	Tomate	Sarchí, Alajuela (finca 2)
Ts-08	Tomate	Sarchí, Alajuela (finca 2)

Fuente: Datos de Laboratorio

5.1.2. Material de referencia.

Para la estandarización de las pruebas moleculares necesarias para el diagnóstico de la bacteria se utilizó el material de referencia proporcionado por el Centro Internacional de la Papa (CIP), el cual es una institución apoyada por el Grupo Consultivo para la Investigación Agrícola Internacional (CGIAR).

Este centro se encuentra ubicado en Perú, y las muestras fueron consignadas para el propósito investigativo por parte del Laboratorio de Bacteriología, División Manejo Integrado de Cultivos. Se usaron en total 5 cepas de esta bacteria (cuadro 5.2).

La presentación de las muestras consistió en cultivos líquidos bacterianos, que fueron lisados y dispensados en tubos *ependorf* de 1,5 ml para luego ser enviados, esto para evitar problemas de bioseguridad.

También se usó como material de referencia una cepa de *R. solanacearum* traída desde la Colección Internacional de Microorganismos de Plantas (ICMP) por sus siglas en inglés que se encuentra ubicado en Nueva Zelanda.

El número de accesoión de esta cepa es ICMP 8049. Fue aislada en Costa Rica en el año 1976, y es biovar 2. Su hospedero en ese momento fue la papa y fue encontrada a una altura de 1600 m.s.n.m por E. French.

Esta cepa fue revivida siguiendo el procedimiento descrito en el catálogo del ICMP. Ya revivida se usó como parámetro para comparar las pruebas de aislamiento, de observación al microscopio y en pruebas moleculares.

Cuadro 5.2 Material de referencia de *R. solanacearum* usado como controles en las pruebas moleculares.

CIP #	Biovar	Hospedero	Lugar de Aislamiento	Año	Colector	Altura
66	1	Papa	Pacayas, Costa Rica	1972	L. Gonzales	1900 m.s.n.m.
90	1	Papa	San Isidro de Coronado, Costa Rica	1976	E. French	1400 m.s.n.m
6	3	Heliconia	Coto, Costa Rica	1959	-----	-----
88	2 ^a	Papa	S. Rafael Oreamuno, Costa Rica	1976	E. French	1500 m.s.n.m
95	2 ^a	Papa	San Juan Chicua, Costa Rica	1973	L. Gonzales	2500 m.s.n.m

Fuente: Laboratorio Bacteriología, Centro Internacional de la Papa (CIP).

5.2. Pruebas preliminares para la detección de *R. solanacearum*

5.2.1. Prueba de exudación del tallo.

Se tomó una planta de cada muestreo, tanto de geranio como de tomate y se lavó con abundante agua para eliminar la suciedad presente en el tejido. Luego se cortaron a nivel de la base del tallo principal y se les hizo otro corte aproximadamente 30 cm hacia el extremo distal del primer corte.

El segmento de tallo se colocó en posición vertical en un beaker con agua destilada estéril y se dejó reposar el sistema por 15 minutos, observando si se daba o no la presencia del exudado.

5.2.2. Aislamiento de *R. solanacearum* en medio de cultivo

Para el aislamiento de la bacteria *R. solanacearum* se usaron 2 medios de cultivo: el medio YPGA y el medio King B. Para la preparación de los medios de cultivo se siguió el procedimiento descrito en el anexo 4.

Dos procedimientos diferentes se ejecutaron, el primero mediante la maceración del tejido afectado y el segundo tomando un pequeño volumen del exudado de la planta que se obtuvo en la prueba anteriormente descrita

En el primero de los procedimientos se tomaron ciertas hojas de las plantas afectadas, se lavaron con abundante agua y se secaron en papel toalla. Luego de esto se procedió a seccionar las partes de las hojas que presentaban daños característicos provocados por la enfermedad, resultando en pequeños fragmentos de hoja de cerca de 5 cm² que poseían partes enfermas como sanas.

Los fragmentos de hoja se colocaron en una placa petri con hipoclorito de sodio al 0.5% por 60 segundos. Después se lavaron dos veces consecutivas con agua destilada estéril y se secaron sobre papel toalla, llevándose posteriormente a la cámara de flujo laminar.

Las secciones de hoja se colocaron en un tubo de ensayo con 5 ml de agua destilada estéril, y se maceraron con una barra de vidrio hasta destruir completamente el tejido.

Luego se procedió a realizar diluciones seriadas a partir de esta maceración hasta llegar a la dilución 1:1000. De cada dilución se sembró 1 ml en las placas con los medios de cultivo mencionados para el aislamiento de *R. solanacearum*.

En el segundo de los procedimientos de aislamiento, se aspiró con una micropipeta un volumen de 500 µl del exudado del tallo de la parte que se apreciaba más blanquecina o con mayor concentración del exudado.

En una cámara de flujo laminar se dispersó el volumen tomado en los diferentes medios de cultivos dispuestos para el aislamiento de la bacteria en estudio. Procediendo a realizar movimiento en “ocho” de la placa para esparcir homogéneamente el líquido sobre ella. Este procedimiento sólo fue empleado para las plantas de tomate.

En ambos procedimientos de aislamiento las placas se incubaron a 28 °C durante 24-48 horas para su revisión. Las placas se revisaron describiendo las características de las colonias presentes.

Dependiendo de la cantidad y características de las colonias presentes se llevaron a cabo purificaciones en los medios King B y Tetrazolio de Kelman (TZC). Con la finalidad de obtener un cultivo puro de cada microorganismo. Las placas de las purificaciones fueron incubadas bajo las mismas condiciones. Las purificaciones se hicieron tomando una pequeña asada del cultivo bacteriano y rayando por estrías en una nueva placa con medio de cultivo. Todas las placas fueron mantenidas a una temperatura de 4 °C para su preservación.

5.2.3. Montaje al microscopio y tinción de bacterias aisladas

Para los montajes se usaron únicamente las placas con los medios YPGA y King B. Se llevaron a cabo tres tipos de montajes al microscopio, el primero se basó únicamente en preparar en un portaobjetos un frotis del cultivo o colonia analizada y bañarlo con una gota de agua destilada estéril. Luego se le colocó el cubreobjetos y se procedió a examinar el montaje con un microscopio óptico con luz transmitida marca Nikon® eclipse e200. Se analizaron a 1000 aumentos, poniendo para ello una gota de aceite de inmersión en el cubreobjetos.

El segundo de los métodos usado consistió en una tinción con safranina, dada la condición de *R. solanacearum* de presentar propiedades de bacteria gram negativa.

Para esta tinción se preparó un frotis de la bacteria en una gota de agua sobre el portaobjetos. El cultivo fue fijado a la llama por unos pocos segundos dejando secar al viento los restos de líquido presentes en la preparación. Luego se bañó el frotis con una gota de solución de safranina al 0.5% dejando reposar por alrededor de 1 minuto. A continuación se lavó cuidadosamente con agua abundante dejándola caer sobre la preparación. Se dejó secar al viento y con la ayuda de papel toalla se eliminaron los excesos del líquido. Después se colocó el cubreobjetos y poniendo una gota de aceite de inmersión se examinó la tinción en el microscopio a 1000 aumentos, analizando las características de los microorganismos observados.

El tercer método consistió en una prueba de tinción con negro Sudán. Para esto se hizo la preparación del frotis y se fijó a la llama. Seguidamente se bañó el frotis con una solución de Negro Sudán, y se dejó reposar por 1 minuto. Luego se procedió a lavar con agua abundante y se dejó secar por poco tiempo.

Finalizado este paso se procedió a bañar el frotis con una solución de safranina al 0.5% y se dejó reposar por un minuto. Al término de este tiempo se lavó la preparación con abundante agua para luego secar al aire y con la ayuda de papel toalla. Se colocó el cubreobjetos y una gota de aceite de inmersión para luego ser analizado al microscopio bajo 1000 aumentos, describiendo las características de los organismos observados.

Para preservar los montajes se colocó alrededor del cubreobjetos una pequeña cantidad de esmalte y se dejó secar por poco tiempo, rotulando debidamente.

5.2.4. Prueba rápida con el kit Agdia® ACL® - Rs inmunostrip para la detección de *R. solanacearum*

Para esta prueba se siguió el protocolo descrito por el *kit* (anexo 5). Para las pruebas a partir de plantas se usaron tres segmentos pequeños de tallo de la base mientras que para las pruebas a partir de cultivo bacteriano se llevaron las placas a la cámara de flujo laminar y se tomó una asada de la colonia que se quería analizar.

5.3. Aislamiento y cuantificación de ADN de las muestras analizadas

5.3.1. Aislamiento de ADN de tejido vegetal

Las extracciones de ADN de plantas se obtuvieron usando para ello el *kit* de extracción *Wizard* de Promega®. En las primeras oportunidades se siguió el procedimiento descrito por el fabricante en su totalidad, pero luego se modificó ligeramente. (anexo 6)

5.3.2. Extracción de ADN de cultivo bacteriano

Para el aislamiento de ADN de cultivo bacteriano se compararon dos métodos de extracción. El primero de ellos fue la utilización del *kit* de extracción *Wizard* de Promega, para este caso se siguió de manera completa el procedimiento descrito en el *kit* (anexo 7).

El segundo procedimiento consistió en una lisis del cultivo. Para esto se probaron diferentes variantes. Se puso en tubos de 200 µl un volumen de 100 µl de agua en ciertos casos y de NaOH 50 mM en otros casos. A cada tubo se le agregó en la cámara de flujo laminar una asada con la colonia bacteriana respectiva.

Los tubos fueron colocados en un termociclador Mastercycler Eppendorf® siguiendo un programa de 5 minutos a una temperatura de 96° C. Luego se procedió a centrifugar unas muestras por 2 minutos a 12 000 rpm, mientras que las otras muestras se dejaron sin centrifugar. Todas las extracciones se almacenaron a -20° C.

5.3.3. Extracción de ADN bacteriano a partir del exudado del tallo

Un último método se aplicó para obtener ADN de *R. solanacearum*. Este consistió en tomar, con una micropipeta del beaker en el que se llevó a cabo la prueba de exudación del tallo, un volumen de 100 µl y dispensarlo en un tubo de 200 µl.

Luego de esto el tubo se colocó en el termociclador y se aplicó el programa de lisis que consistió en 5 minutos a una temperatura de 96° C. Al término de la lisis las muestras se almacenaron a una temperatura de -20° C.

5.4. Cuantificación de ácidos nucleicos por espectrofotometría

La cuantificación de ácidos nucleicos se realizó únicamente para las muestras que se procesaron utilizando el *kit* de extracción especificado.

Estas cuantificaciones se hicieron en un Biophotometer Eppendorf®. El procedimiento contempló en primer lugar preparar una dilución de 1:500, agregando 1 µl de muestra a 499 µl de agua ultrapura estéril. Luego de esto todas las muestras fueron comparadas contra un blanco de agua ultrapura estéril, siendo leídas una a una en el cuantificador, para obtener la concentración de ADN en ng/µl.

De acuerdo con los datos obtenidos en la cuantificación se llevaron a cabo diluciones en agua ultrapura estéril, con el fin de obtener una cantidad de ADN óptima para la amplificación y además de que fuera homogénea para todas las muestras. Para las muestras obtenidas por medio de lisis no se llevaron a cabo cuantificaciones, lo que se hizo fue tomar un pequeño volumen de la lisis directamente y de observarse algún tipo de inhibición se llevaron a cabo diluciones de la misma.

5.5. Diagnóstico Molecular de *R. solanacearum*

El diagnóstico molecular de la bacteria *R. solanacearum* se basó en dos reacciones en cadena de la polimerasa (PCR), para las cuales se utilizaron dos pares de imprimadores o iniciadores. La primera pareja de iniciadores denominados OLI-1 y Y-2 (anexo 2) se usaron para determinar la presencia de esta bacteria a nivel de especie.

Una segunda reacción se realizó utilizando la pareja de imprimadores B2-I-F y B2-II-R (anexo 3), los cuales sirvieron para determinar la presencia de esta bacteria, pero a nivel de biovar 2 específicamente.

5.5.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección de la especie *R. solanacearum*.

Para establecer el protocolo de diagnóstico a nivel de especie usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se usó como base la investigación llevada a cabo por Seal *et al.*, (1992). Incorporando a este procedimiento diferentes concentraciones de reactivos, condiciones y aditivos adicionales a la mezcla de reacción, de manera que se pudiera establecer la mejor combinación de estos de acuerdo con las capacidades y recursos del laboratorio.

Se preparó la mezcla de reacción en un tubo eppendorf de 1,5 ml estéril, añadiendo los componentes que se detallan en el cuadro 5.3 en el mismo orden en que se citan. Durante la preparación de la mezcla, los reactivos y tubos de reacción fueron mantenidos sobre hielo.

En cuanto a las variantes que se le hicieron a esta mezcla de reacción original propuesta, está en primer lugar la utilización de Cloruro de Magnesio a una concentración de 1,5 mM tomando como referencia lo descrito por Roncal *et al.*, (1999). Esto ya que el laboratorio no contaba con el buffer especificado que contuviera este elemento. Además se utilizó una mezcla de nucleótidos (d-NTP's) y no cada uno por separado como se especifica, la concentración de esta fue de 0,2 mM.

Además el volumen de los imprimadores que se agregó fue diferente ya que la concentración de trabajo a la que se encontraban era diferente a la concentración que se reporta originalmente.

Los imprimadores OLI-1 y Y-2 se utilizaron inicialmente como lo muestra el cuadro 5.3, a una concentración de 1 μ M tomando como base lo informado por Seal *et al.*, (1992). Pero además de esta concentración fueron utilizados a una concentración de 0,5 μ M, de manera que dos concentraciones diferentes de imprimadores fueron probadas, para determinar cuál resultaba más efectiva.

Otra variante a la mezcla de reacción fue la adición de BSA (Suero de Albúmina Bovina) en cantidades que permitieran obtener en cada reacción una concentración final de 500 ng/ μ l. Esto con el fin de comparar si la adición de este elemento mejoraba en alguna medida la amplificación.

Cuadro 5.3 Mezcla de reacción tomada como base para la detección molecular de *R. solanacearum* a nivel de especie.

Componente	Concentración Final	Volumen para 1 reacción
Agua destilada estéril o ultrapura		37,5 µl
Buffer para PCR 10X	1X	5,0 µl
MgCl ₂ 25 mM	1,5 mM	3,0 µl
d-NTP's 10 mM	0.2 mM	1,0 µl
Imprimador OLI-1 (85 uM)	1,0 uM	0,59 µl
Imprimador Y-2 (75 uM)	1,0 uM	0,67 µl
Taq Polimerasa	1,0 U	0,2 µl
ADN blanco*		2,0 µl
	Volumen total de reacción.	50 µl

Fuente: Seal *et al.*, 1992

*La cantidad de ADN variaba ya que el autor aconseja llevar a cabo la lisis de una solución de 10⁶ células por ml, realizar diluciones decimales y tomar de cada dilución ese volumen.

Diferentes concentraciones de ADN blanco fueron analizadas. Para las muestras provenientes de plantas obtenidas con el *kit* de extracción y que fueron cuantificadas. Se probaron concentraciones de 1 ng, 5 ng, 10 ng, 50 ng y 250 ng. Cada una de las cantidades en un volumen de 2 µl.

En cuanto a las extracciones de cultivo puro también se probaron diferentes concentraciones de ADN entre estas están: 2.5 ng, 10 ng, 25 ng, 50 ng y 100 ng. Cabe destacar que para las muestras que al ser cuantificadas mostraban concentraciones muy bajas o incluso 0; se puso un volumen de 2 μ l directamente de la extracción y de una dilución 1:10 a partir de esta extracción.

En las muestras que siguieron un proceso de lisis incluyendo el material de referencia, se tomaron 2 μ l de cada lisis y se colocaron directamente en la mezcla de reacción. También fueron analizadas diluciones decimales (1:10 y 1:100) de estas lisis para efectos de determinar la mejor.

Otro factor que fue variado en cuanto a la preparación de la mezcla de reacción fue el volumen final de reacción ya que en primer lugar se usó un volumen de 50 μ l según lo reportado, pero se experimentó también con un volumen de reacción final de 25 μ l por lo que en este caso la cantidad de los reactivos disminuyó proporcionalmente a excepción del volumen de ADN blanco que fue mantenido en 2 μ l.

Una vez completada la mezcla de reacción los tubos fueron centrifugados en una microcentrífuga de bajas revoluciones por un tiempo de 3-5 segundos y fueron colocados en el termociclador Mastercycler Eppendorf®.

En un inicio se aplicó el perfil térmico descrito por Seal *et al.*, (1992) (cuadro 5.4). Pero al igual que en la mezcla de reacción otras condiciones fueron analizadas para determinar la más óptima.

Cuadro 5.4 Perfil térmico tomado como base para la detección molecular de *R. solanacearum* a nivel de especie.

Ciclos	Paso	Temperatura	Tiempo
1	Desnaturalización inicial	96° C	2 minutos
50	Desnaturalización	94° C	20 segundos
	Hibridación del imprimador	68° C	20 segundos
	Extensión de la copia	72° C	30 segundos
1	Extensión final	72° C	10 minutos
1	Mantenimiento	4° C	Indefinido

Fuente: Seal *et al.*, 1992

La primera condición del perfil térmico que fue analizada fue la temperatura de hibridación del imprimador, ya que además de los 68 °C reportados se usaron las temperaturas de 68.5 °C, 69 °C, 69.5 °C y 70 °C.

La segunda condición que fue variada fue el tiempo de extensión final para lo cual se probaron tanto 10 minutos que se reporta como un tiempo de 5 minutos.

5.5.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa para la detección del biovar 2 de *R. solanacearum*

Para la detección del biovar 2 de esta bacteria se usó como referencia la investigación realizada por Williamson *et al.*, (2002). Al igual que para el caso de la detección a nivel de especie, se realizaron algunos cambios en las concentraciones de los reactivos de la mezcla de reacción y en las condiciones de amplificación, para determinar cual era la mejor combinación de elementos para una adecuada detección.

A la mezcla de reacción original propuesta por Williamson *et al.*, (2002) se le cambiaron dos elementos. En primer lugar se utilizaron imprimadores a una concentración de trabajo de 5 μM . Esto se logró por medio de una dilución de los imprimadores B2-I-F y B2-II-R que se encontraban a una concentración de 100 y 81 μM respectivamente. También se usaron los imprimadores a una concentración de trabajo de 20 μM . Además en las primeras reacciones llevadas a cabo, se agregaron 2 μl de lisis bacteriana y no 50 ng de ADN, como lo reportan los autores.

Se preparó la mezcla de reacción en un tubo eppendorf de 1,5 ml autoclavado, añadiendo los reactivos que se detallan en el cuadro 5.5 en ese mismo orden. Durante la preparación de esta mezcla los tubos fueron mantenidos sobre hielo.

Dos mezclas de reacción diferentes fueron probadas. En la primera se utilizaron 10 pmoles de cada uno de los imprimadores; esto corresponde a una concentración de 0,33 μM , si se toma en cuenta que el volumen final de cada reacción fue de 30 μl . En la segunda mezcla de reacción probada se usó una concentración de imprimadores equivalente a 0,66 μM .

Cuadro 5.5 Mezcla de reacción tomada como base para la detección molecular de *R. solanacearum* a nivel de biovar 2.

Componente	Concentración Final	Volumen para 1 reacción
Agua destilada estéril o ultrapura		17,5 µl
Buffer para PCR 10X	1X	3,0 µl
MgCl ₂ 25 mM	2,5 mM	3,0 µl
d-NTP's 10 mM	0,25 mM	0,75 µl
Imprimador B2-I-F (5 uM)	0,33 uM	2,0 µl
Imprimador B2-II-R (5 uM)	0,33 uM	2,0 µl
Taq Polimerasa	1,0 U	0,2 µl
ADN blanco* 25ng/ul	50 ng	2,0 ul
	Volumen total de reacción.	50 µl

Fuente: Willianson *et al*, 2002

*La cantidad de ADN varió, y para los casos de lisis bacteriana no se cuantificó la cantidad de ADN que se agregó a cada reacción.

La última de las variables propuesta a la mezcla de reacción fue el uso del Cloruro de Magnesio a dos concentraciones diferentes a la propuesta, tanto a 1,5 mM como a 3,5 mM.

Cuando se probaron las muestras obtenidas por medio de aislamiento de ADN con el *kit Wizard* de Promega®, la cantidad de ADN que se agregó si fue cuantificada. Diferentes cantidades de ADN fueron probadas entre estas: 100 ng, 50 ng, 25 ng y 10ng. Se mantuvieron las cantidades de ADN en un volumen de 2 μ l.

La utilización de BSA (Suero de Albúmina Bovina) como aditivo a una concentración final de 500 ng/ μ l, también fue ensayada. Esto con el fin de evaluar su impacto en la amplificación.

Una vez completada la mezcla de reacción los tubos fueron centrifugados en una microcentrífuga de bajas revoluciones por un tiempo de 3-5 segundos y fueron colocados en el termociclador Mastercycler Eppendorf®. El perfil térmico que se aplicó se especifica en el cuadro 5.6. Este perfil es el que reportan Williamson *et al.*, (2002).

Diferentes perfiles térmicos fueron experimentados, variando únicamente la temperatura de hibridación de los imprimadores. Usando temperaturas de hibridación que van desde los 65 °C hasta los 72 °C, y variando en cada caso 1 °C.

Cuadro 5.6 Perfil térmico tomado como base para la detección molecular de *R. solanacearum* a nivel de biovar 2.

Ciclos	Paso	Temperatura	Tiempo
1	Desnaturalización inicial	94° C	5 minutos
40	Desnaturalización	94° C	30 segundos
	Hibridación del imprimador	70° C	30 segundos
	Extensión de la copia	72° C	1 minuto
1	Extensión final	72° C	10 minutos
1	Mantenimiento	4° C	Indefinido

Fuente: Willianson *et al.*, 2002

5.6. Electroforesis y visualización de las amplificaciones

Para el caso de la detección a nivel de especie, las muestras se corrieron en geles de agarosa al 2% (m/v), preparados con buffer TBE 0,5 X. Se utilizó una tinción con una solución de Bromuro de Etidio (10 mg/ml), añadiendo 2 µl de esta solución por cada 50 ml de gel.

Para el montaje de las muestras en los geles se tomaron 10 µl de amplificación y se mezclaron con 2 µl de buffer de carga 6X. Además se colocó marcador de peso molecular de 50 bp.

Las condiciones de corrida fueron de 85 V durante 1 hora. En los casos que no se notó una buena separación de las bandas media hora adicional de corrida fue necesaria.

Para la visualización de las bandas, los geles fueron trasladados a un transiluminador donde fueron tomadas las fotografías por una cámara Kodak® 290. Las fotografías fueron analizadas digitalmente usando el software Kodak® 290 IDE.

Para poder visualizar las amplificaciones de las pruebas para la detección del biovar 2, un tratamiento inicial de precipitación del ADN fue llevado a cabo. Esto tomando en cuenta la recomendación de Williamson *et al.*, (2002) los cuales reportaron que usualmente la cantidad de ADN producido era poca por lo cual una precipitación era necesaria.

Al ADN amplificado se le agregaron 2,5 volúmenes de etanol absoluto, se dejó reposar por 5 minutos y luego se centrifugo a 13 000 g por 2 minutos. Terminado este paso se decanto el alcohol dejando secar el botón al aire y resuspendiéndolo en 20 µl de agua ultrapura estéril. Todo este volumen se montó en los respectivos geles.

Cabe destacar que también se siguió un procedimiento que no contempló este tratamiento de precipitación. En estos casos se montó todo el volumen de reacción (30 µl) mezclado con 5 µl de buffer de carga 6X como primera alternativa y 15 µl de amplificación que fueron mezclados con 3 µl de buffer de carga 6X como segunda alternativa. Como patrón se usó un marcador de peso molecular de 50 bp

En ambos casos las muestras fueron corridas en geles de agarosa al 2% (m/v) preparados con buffer TBE 0,5 X. Se utilizó una tinción con una solución de Bromuro de Etidio (10 mg/ml), añadiendo 2 µl de esta solución por cada 50 ml de gel. Las condiciones de corrida consistieron en 85 V durante 1,5 - 2 horas.

6. RESULTADOS

6.1. Análisis de los síntomas de las plantas muestreadas.

Fue el primer elemento tomado en cuenta para llevar a cabo un diagnóstico de la enfermedad producida por la bacteria *R. solanacearum*. De forma general se encontró que en Costa Rica existen muchos cultivos que son afectados por esta bacteria, entre los principales se encuentran el tomate y el banano. Se logró determinar que las producciones de geranio son afectadas con baja frecuencia en la actualidad, esto debido a los enormes cuidados que han implementado las empresas productoras.

Las plantas de geranio muestreadas presentaban síntomas muy similares entre ellas. Se encontró un amarillamiento del follaje así como una clorosis limitada a ciertas zonas de las hojas. Las plantas presentaron además una necrosis en forma de “V” hacia los bordes de la hoja. Luego de cierto tiempo las hojas fueron cayendo hasta terminar con la muerte de las plantas (figura 6.1).

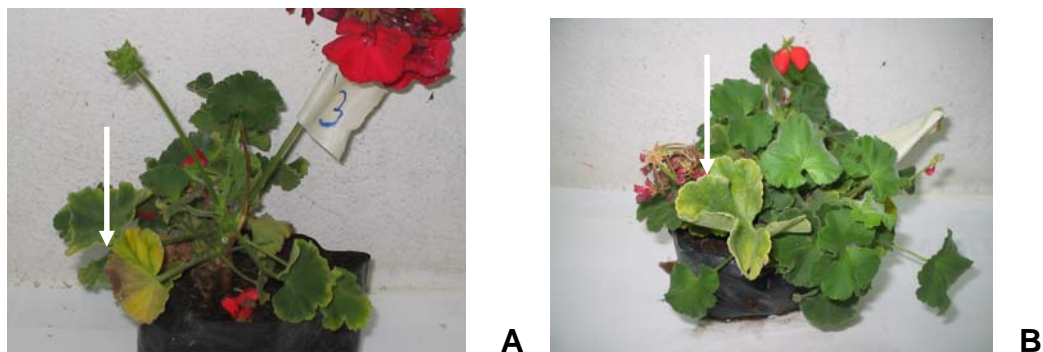


Figura 6.1 Síntomas observados en plantas de geranio muestreadas. A. Muestra Ge-03, se señala necrosis en forma de “V”. B. Muestra Ge-01, se señala clorosis en la hoja.

En cuanto a los síntomas observados en las plantas de tomate, se puede decir que se encontraron diferencias entre los muestreos. Las plantas provenientes de Yas de Cartago presentaron el daño conocido como marchitez de la planta, con un decaimiento generalizado, llegando en los estados más avanzados de la enfermedad a la muerte total. Las hojas presentaban un pequeño amarillamiento, aunque se encontraron hojas verdes que de la misma forma estaban decaídas o marchitas.

Las plantas provenientes de la zona de Sarchí exhibían diferentes síntomas dependiendo de la finca donde fueron colectadas. Las muestras de la finca 1 demostraron daños muy similares a los encontrados en el Yas de Cartago, con una marchitez generalizada en todo el follaje de la planta (figura 6.2).

Las muestras de la finca 2 demostraban un amarillamiento de forma más acentuada con lesiones aparentemente más secas y con hojas secas. Además la enfermedad no se expresaba en toda la planta y la marchitez no era tan evidente.



Figura 6.2 Síntomas observados en plantas de tomate muestreadas, Muestra Ts-01, se observa la marchitez generalizada.

6.2. Pruebas preliminares para la detección de *R. solanacearum*

6.2.1. Prueba de exudación del tallo.

En el caso de las plantas de geranio, no se observó ningún tipo de exudación del tallo luego de los 15 minutos en los que se colocó el segmento en el agua. Por lo cual en este caso la prueba resultó ser negativa.

Cuando la prueba se le aplicó a las plantas originarias de Yas de Cartago, se observó aproximadamente a los 5 minutos de estar el segmento de tallo en agua, una emanación de un hilo blancuecino fino que precipitaba. Este fenómeno se mantuvo durante los 30 minutos que duró la prueba y se puede observar en la figura 6.3.

Las muestras de la finca 1 de Sarchí mostraron resultados positivos para esta prueba mientras que las plantas de la finca 2 de Sarchí mostraron resultados negativos

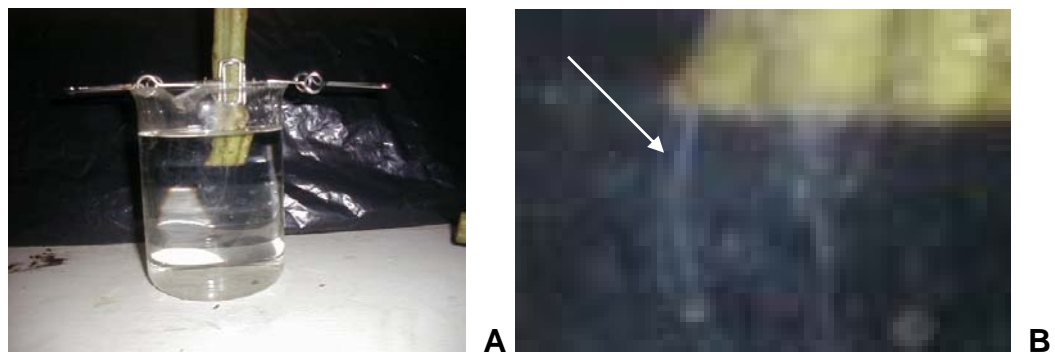


Figura 6.3 Muestra Ts-01 mostrando un resultado positivo en la prueba de exudación del tallo. B. Se señala el exudado.

En el siguiente cuadro se resumen los resultados que arrojó esta prueba, nótese que se muestra únicamente una planta por cada uno de los muestreos, según la codificación presente en el cuadro 5.1.

Cuadro 6.1 Resultados obtenidos en la prueba de exudación del tallo de las diferentes muestras analizadas.

Código de muestra	Resultado de la prueba
Ge-01	Negativa
Tc-01	Positiva
Ts-01	Positiva
Ts-05	Negativa

Fuente: Datos de Laboratorio

6.2.2. Aislamiento de *R. solanacearum* en medio de cultivo

Los aislamientos en los medios de cultivo arrojaron resultados muy diversos dependiendo del hospedero, del método de aislamiento y por último del medio que fue utilizado para tal propósito.

Como se puede apreciar en el cuadro 6.2, el aislamiento a partir de las plantas de geranio en medio YPGA y siguiendo el método de la maceración, mostró la presencia de dos colonias bacterianas claramente distinguibles en cuanto a su morfología. La primera presentó un color entre crema y amarillento y con poca fluidez; no presentó verticilos, de una forma irregular y un borde entero. La segunda colonia se caracterizó por presentar un color un poco más claro y con mayor fluidez; además tenía una forma circular con el borde entero (figura 6.4).

Cabe destacar que estos resultados se obtuvieron de la placa correspondiente a la dilución 1:1000 de los aislamientos, debido a que se logró comprobar que en las placas correspondientes a diluciones más concentradas el crecimiento fue tan alto, que no se pudo diferenciar entre las colonias presentes. Cada colonia se purificó en una nueva placa.

Las plantas provenientes del Yas de Cartago se utilizaron para llevar a cabo un aislamiento en medio YPGA siguiendo el procedimiento de maceración. En la placa correspondiente a la dilución 1:1000 se encontró la presencia de una colonia bacteriana de aspecto lechoso, color crema y forma un poco circular.

En tanto el aislamiento a partir de las plantas de tomate provenientes de la finca 1 de Sarchí siguiendo dos procedimientos diferentes, arrojó resultados que variaron entre un método y el otro.

Siguiendo el método de maceración y en medio de cultivo King B se obtuvo en la placa de mayor dilución, el crecimiento de dos colonias diferentes. Como lo muestra el cuadro 6.2 ambas presentaron morfología similar, con colonias entre circulares e irregulares y un poco fluidas. Éstas se diferenciaban únicamente por su color mostrando unas un color amarillo y las otras un color crema. Se llevó a cabo una purificación de las colonias.

Por otro lado siguiendo el método del exudado y en medio de cultivo King B fue necesaria la purificación de las colonias presentes en las placas, para su mejor análisis. Se lograron aislar en cultivo puro dos tipos de colonias diferentes. La primer colonia presentó color blanco, forma circular y una estructura interna translúcida. Mientras tanto la otra colonia presentó color crema, aspecto un poco lechoso y forma circular. Para analizarlas mejor se purificaron estas colonias tanto en medio King B como en medio TZC (figura 6.4).

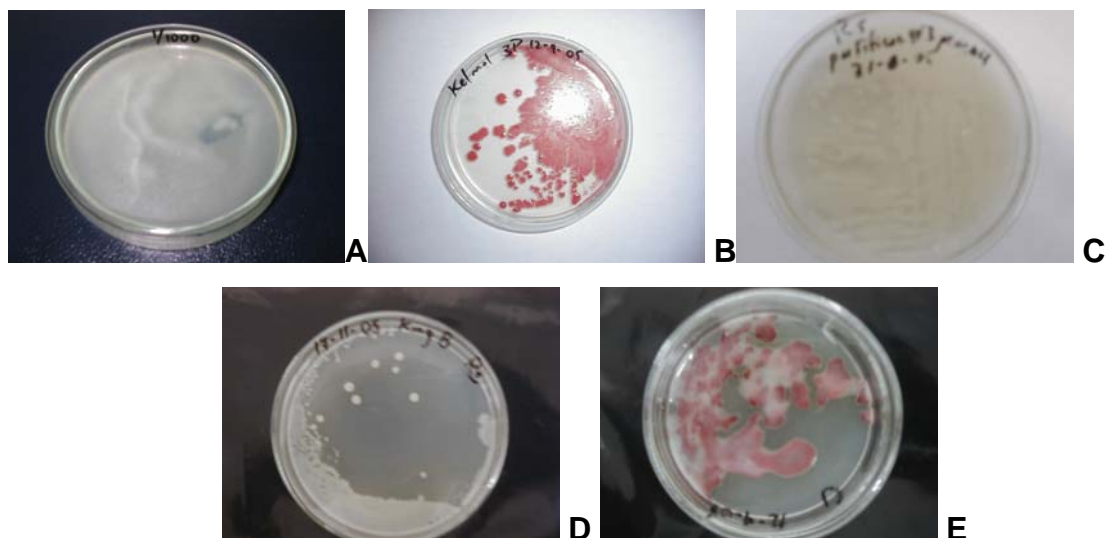


Figura 6.4 Aislamientos bacterianos obtenidos a partir de diferentes muestras analizadas. A. Cultivo de geranio por el método de maceración dilución 1:1000 en medio YPGA. B y C. Cultivo de tomate finca 1 de Sarchí por el método de exudado, purificación en medio TZC y King B respectivamente. D y E. Control positivo en medio de cultivo TZC y King B respectivamente.

Como se observa en el cuadro 6.2, en el medio King B las colonias mantuvieron su morfología mientras que en el medio TZC; la primera colonia casi no creció presentando solamente unos pequeños puntos rojos. La segunda colonia creció en mayor cantidad presentando colonias color entre blanco y crema de aspecto lechoso, fluido y con puntos entre rojo y rosado en el centro de las colonias bacterianas.

En este apartado hay que hacer mención de las características mostradas por la cepa ICMP #8049 la cual se usó como control positivo en estas pruebas. El cuadro 6.2 resume estas características, en el medio de cultivo King B las colonias de esta cepa presentaron una forma circular de color entre crema y nacarado con borde entero y aspecto lechoso. Mientras tanto en medio TZC las colonias de esta resultaron circulares de color blanco con puntos de color rojo sangre en el centro; en una purificación posterior el color rojo sangre se hizo más claro llegando a ser entre rojo y rosado (figura 6.4). Las plantas provenientes de la finca 2 de Sarchí no se usaron para llevar a cabo aislamiento en medio de cultivo.

Cuadro 6.2 Resultados obtenidos en los diferentes aislamientos de bacterias presentes en las muestras analizadas

Origen muestra	Hospedero	Método aislamiento y purificación	Medio Cultivo	Colonias aisladas	Descripción morfológica colonia
Agua Caliente, Cartago	Geranio	Maceración, dilución y extensión en placa	YPGA	2	Color crema forma irregular, borde entero
					Color blanco forma circular borde entero
Yas, Cartago	Tomate	Maceración, dilución y extensión en placa	YPGA	1	Aspecto lechoso, color crema y circular
Finca 1, Sarchí	Tomate	Maceración, dilución y rayado en placa	King B	2	Color Amarillo, irregular fluida
					Color crema, irregular, fluida
		Exudado, extensión y purificación por rayado	King B	1	Color crema, lechosa, fluida y circular
			TZC	1	Circular, color crema con puntos rosados en el centro
Control positivo, ICMP #8049	Papa	Resuspensión de cepa extensión en placa y purificación por rayado	King B	1	Circular color crema-nacarado, aspecto lechoso, fluida con borde entero
			TZC	1	Blanca, con puntos rojo sangre en el centro

Fuente: Datos de Laboratorio

6.2.3. Montaje al microscopio y tinción de bacterias aisladas

Se encontró una relación entre la morfología de colonia en la placa y las características que presentó la bacteria al microscopio. Esto aunque algunas diferencias a nivel macroscópico fueron muy difíciles de detectar y ciertas colonias con aspecto similar contenían bacterias que a nivel microscópico eran muy diferentes sobre todo en el tamaño.

En el cuadro 6.3 se resumen los datos obtenidos en los montajes al microscopio teñidos con safranina. Se referencian las colonias del cuadro 6.2 en ese mismo orden omitiendo las colonias de las placas con medio TZC las cuales no se observaron al microscopio.

Todas las bacterias se tiñeron de rojo con safranina. La tinción con negro Sudán no dio los resultados esperados y el montaje sin colorante y sólo con agua sirvió para determinar la motilidad del microorganismo, pero no brindó mayores detalles.

Aunque las pruebas de aislamiento y montaje al microscopio no arrojaron datos claros y determinantes, se estableció que sólo tres colonias de todas las aisladas concordaron con las características tanto a nivel macroscópico como microscópico que mostró el control positivo.

De estas 3 colonias una fue aislada a partir de plantas de tomate del Yas de Cartago por el método de maceración; y las restantes 2 fueron aisladas de plantas de tomate de la finca 1 de Sarchí, una de ellas con el método de maceración y la otra con el método de exudado. Demostrando además que los aislamientos de plantas de geranio no concuerdan con el control positivo.

Cuadro 6.3 Descripción microscópica de colonias presentes en los aislamientos de bacterias presentes en las muestras analizadas

Origen del Aislamiento	Descripción colonia (cuadro 6.2)	Descripción microscópica
Agua Caliente, Cartago	Color crema forma irregular, borde entero	Bacilo, de tamaño mediano relativamente y con movilidad
	Color blanco forma circular borde entero	Bacilo, de tamaño mediano relativamente y con movilidad
Yas, Cartago	Aspecto lechoso, color crema y circular	Bacilo, muy pequeño relativamente y con movilidad
Finca 1, Sarchí	Color Amarillo, irregular fluida	Bacilo grande y grueso relativamente con movilidad
	Color crema, irregular, fluida	Bacilo, muy pequeño relativamente y con movilidad
	Color crema, lechosa, fluida y circular	Bacilo, muy pequeño relativamente y con movilidad
Control positivo, ICMP #8049	Circular color crema-nacarado, aspecto lechoso, fluida con borde entero	Bacilo, muy pequeño relativamente casi como coco y con movilidad

Fuente: Datos de Laboratorio

Como se aprecia en el cuadro 6.3 se determinó la presencia de 3 bacterias diferentes basado principalmente en el tamaño. En la figura 6.5 se puede observar la diferencia entre estos 3 tamaños de bacterias observados.

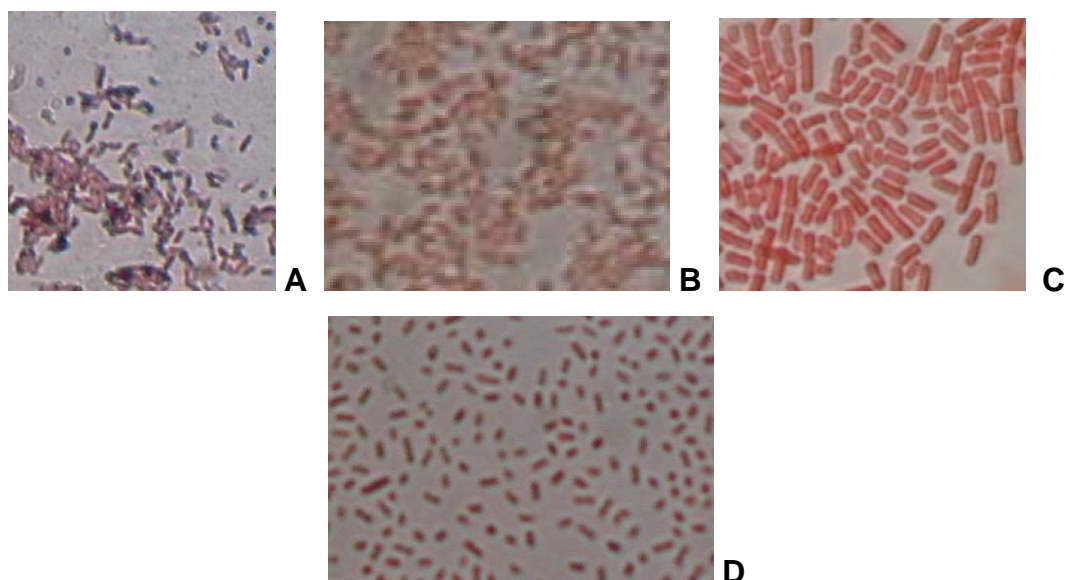


Figura 6.5 Bacterias observadas en los montajes al microscopio. A. Bacilos medianos. B. Bacilos pequeños. C. Bacilos más grandes y gruesos. D. Control positivo, nótese la concordancia con B.

6.2.4. Prueba rápida con el kit Agdia® ACL® - Rs inmunostrip para la detección de *R. solanacearum*

Los resultados alcanzados con esta prueba cuando se efectuó en plantas se denotan en el cuadro 6.4. Nótese que de los cuatro muestreos solamente en dos casos las plantas brindaron resultados positivos para esta prueba, en el muestreo en el Yas de Cartago y en la finca 1 de Sarchí.

Cuadro 6.4 Resultados obtenidos en la prueba con el *kit Agdia® ACL® - Rs inmunostrip* con las diferentes muestras analizadas.

Código de muestra	Resultado de la prueba
Ge-01	Negativa
Tc-01	Positiva
Ts-01	Positiva
Ts-05	Negativa

Fuente: Datos de Laboratorio

Como se puede observar en el cuadro 6.4, los resultados de esta prueba concuerdan con los del cuadro 6.1. Por otro lado cuando la prueba se efectuó con colonias bacterianas aisladas de las diferentes plantas se obtuvieron de la misma forma resultados que concuerdan con las pruebas de aislamiento y montaje al microscopio. De manera que exclusivamente las colonias que concordaron con el control positivo en el aislamiento y en el montaje al microscopio arrojaron resultados positivos en esta prueba (figura 6.6)

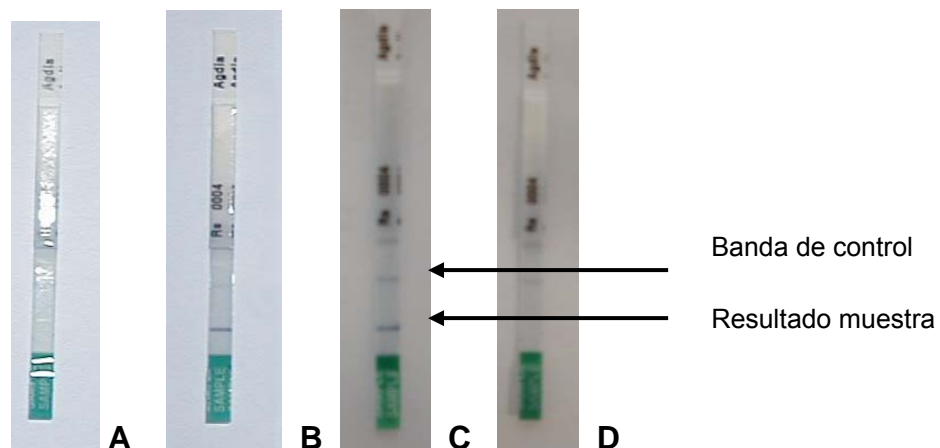


Figura 6.6 Resultado de prueba con el *kit Agdia® ACL® - Rs inmunostrip* con las diferentes muestras analizadas. A. Ge-01, negativa. B. Tc-01, positiva. C. Ts-01, positiva. D. Ts-05, negativa.

6.3. Aislamiento y cuantificación de ADN de las muestras analizadas

6.3.1. Aislamiento de ADN de tejido vegetal

Las extracciones de ADN de plantas con el kit *Wizard* de Promega® arrojaron datos muy variables en cuanto a la concentración y pureza de ADN que se logró obtener.

Sin embargo, el ADN obtenido no presentó problemas en las diferentes amplificaciones cuando se usó a una concentración adecuada incluso las extracciones que mostraron una cantidad de 0 ng/ul pudieron ser amplificadas.

Se demostró que los cambios aplicados al protocolo mejoraron la cantidad de ADN obtenida. Los datos completos de las extracciones obtenidas se pueden observar en el anexo 10.

6.3.2. Extracción de ADN de cultivo bacteriano

Con las extracciones de ADN a partir de cultivo bacteriano utilizando el kit *Wizard* de Promega® se consiguieron cantidades de concentración y pureza muy variables de una extracción a otra. Los datos de forma completa se detallan en el anexo 10.

Mientras tanto las extracciones por medio de lisis bacteriana resultaron ser mejores en cuanto a tiempo y a facilidad. Esto porque en tan solo 5 minutos de lisis fue posible obtener ADN amplificable. Sin embargo, por medio de lisis no se pudo establecer la cantidad exacta de ADN que se puso a reaccionar, esto dependió de la cantidad de colonias que se tomó para la lisis.

6.3.3. Extracción de ADN bacteriano a partir del exudado del tallo

No se encontró diferencia entre la amplificación de ADN obtenido por extracción y la amplificación de ADN obtenido de la lisis del exudado bacteriano.

6.4. Diagnóstico Molecular de *R. solanacearum*

6.4.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección de la especie *R. solanacearum*

Los imprimadores OLI-1 y Y2, demostraron ser adecuados para la detección molecular de la especie *R. solanacearum*, esto se comprobó mediante la amplificación de los controles positivos facilitados por el Centro Internacional de la Papa (CIP) (cuadro 5.2). Para todos los controles se produjo la banda esperada de 288 bp, aunque representaran biovares diferentes (figura 6.7).

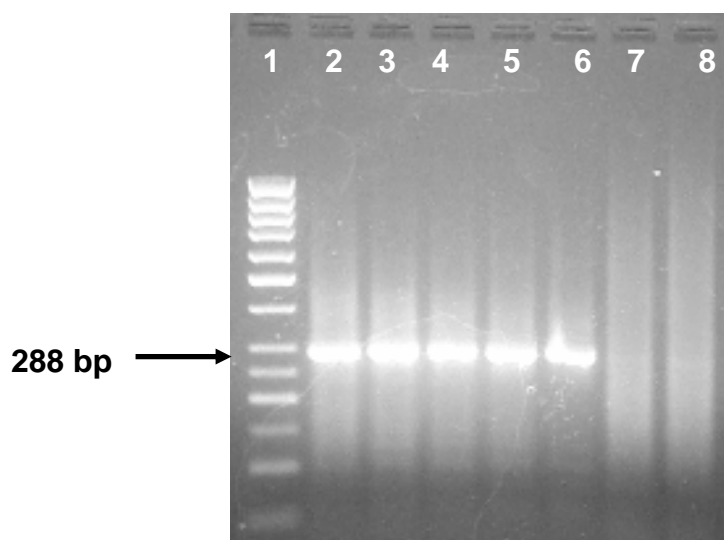


Figura 6.7 Amplificación de ADN con imprimadores OLI-1 y Y-2 para los controles positivos de *R. solanacearum* suministrados por el CIP. Carril 1. Marcador de peso 50 bp. 2. CIP# 6. 3. CIP# 66. 4. CIP# 88. 5. CIP# 90. 6. CIP#95. 7 y 8. Controles negativos

En cuanto a la estandarización y optimización de la reacción, hay que decir que la disminución del volumen de reacción de 50 μ l hasta 25 μ l no produjo diferencia en cuanto a la amplificación.

La reducción en la concentración de los imprimadores de 1 μ M a 0,5 μ M no presentó efecto negativo sobre la amplificación de la banda de 288 bp, pero si ocasionó la reducción en la aparición de bandas inespecíficas de bajo peso molecular (figura 6.8)

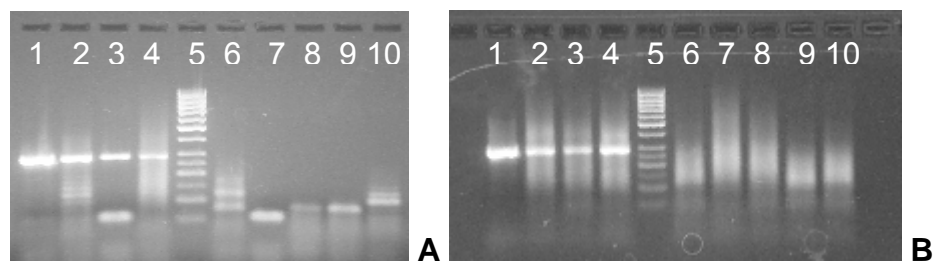


Figura 6.8 Amplificación de ADN con imprimadores OLI-1 y Y-2, mostrando diferentes concentraciones de imprimadores. A. Concentración de 1 μ M. B. Concentración de 0,5 μ M. Los carriles corresponden a las mismas muestras. Carril 1. control positivo CIP# 88. 2-4. Plantas Ts-01, Ts-03, Ts-04. 5. Marcador de peso 50 bp. 6-7. Lisis bacteriana en NaOH, aislamiento finca 1 Sarchí por maceración. 8-9. Lisis bacteriana en agua, aislamiento finca 1 Sarchí por maceración. 10. Control negativo.

Se logró establecer que la adición de BSA a la reacción produce efectos positivos, ya que muestras, sobre todo de las plantas que no mostraron amplificación sin este elemento, manifestaron la banda de 288 bp luego de agregar dicha proteína a la mezcla de reacción.

Además se determinó que altas concentraciones de ADN en la reacción inhiben sensiblemente la amplificación, estableciéndose que la cantidad idónea de ADN va desde 10 ng hasta 50 ng. Esto fue válido tanto para los casos de las extracciones de planta como las de cultivo bacteriano.

Las lisis bacterianas tanto de cultivo como de exudado demostraron ser un método eficiente para obtener ADN amplificable. No obstante un exceso en la cantidad de cultivo que se lisa puede producir inhibición de la amplificación.

Por otro lado se determinó que un leve aumento de temperatura permite la eliminación de las amplificaciones inespecíficas de bajo peso molecular, este hecho se puede observar en la figura 6.9 donde los controles positivos 1A y 1B mostraron diferencia manifestando a 69 °C la desaparición de las bandas inespecíficas de bajo peso. Por otro lado este efecto también se observó en muestras negativas, siendo notoria la diferencia entre 10A y 10B.

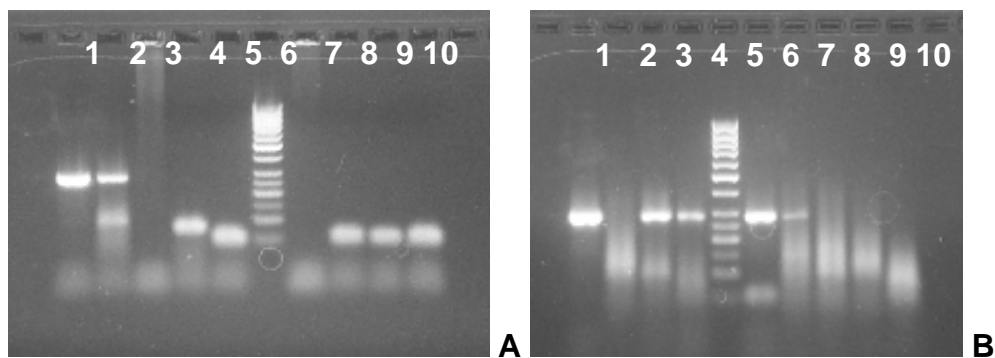


Figura 6.9 Amplificación de ADN con imprimadores OLI-1 y Y-2, mostrando diferentes temperaturas de hibridación de los imprimadores. A. 68 °C. B. 69 °C. Carril 1A. Control positivo CIP#88; 2A. Planta Ts-01; 3A-5A. Diluciones de ADN lisis bacteriana en agua, aislamiento Yas de Cartago por maceración; 6A. Marcador de peso 50 bp; 7A-9A. Diluciones de ADN lisis bacteriana en agua, aislamiento finca 1 Sarchí por maceración; 10A. Control negativo; 1B. Control positivo CIP#88; 2B y 7B. Aislamientos Yas de Cartago por maceración; 3B, 4B y 5B. Plantas Ts-01, Ts-03, Ts-04 respectivamente; 5B. Marcador de peso 50 bp; 7B y 9B. Aislamientos finca 1 Sarchí por maceración; 10B. Control negativo.

Con respecto al diagnóstico y detección de la bacteria en las muestras analizadas los resultados se resumen en el cuadro 6.5. Las muestras de la finca 2 de Sarchí no fueron analizadas por PCR debido a los resultados negativos mostrados por estas en todas las pruebas preliminares. Las de geranio aunque también resultaron negativas anteriormente se analizaron por PCR para tener un parámetro de medición en esta especie. Se muestra en el cuadro 6.5 una planta por muestreo, ya que se demostró que entre las plantas de cada muestreo no existió ninguna diferencia.

Cuadro 6.5 Resultados obtenidos en la prueba de PCR para el diagnóstico de *R. solanacearum* a nivel de especie

Muestra	Resultado de la prueba
Planta Ge-01	Negativa
Planta Tc-01	Positiva
Planta Ts-01	Positiva
Aislamiento Yas Cartago por maceración	Negativa
Aislamiento finca 1 Sarchí por maceración	Positiva*
Aislamiento finca 1 Sarchí por exudado	Positiva
Lisis de exudado planta Ts-01	Positiva

Fuente: Datos de Laboratorio

*Nota: los resultados de esta muestra no fueron consistentes, sólo en pocas ocasiones mostró amplificación y en estos casos fue débil.

Fuente: Datos de Laboratorio

Para finalizar se determinó que la disminución del tiempo de extensión final a 5 minutos disminuye la intensidad de las bandas en los controles positivos y por ende afecta la amplificación.

Se definió como mezcla de reacción más adecuada la que contempla un volumen de 25 µl de reacción. Además una concentración de imprimadores de 0,5 µM cada uno y la adición de 0,62 µl de BSA por reacción. Se definió que la cantidad de ADN debe estar entre 10-50 ng y la concentración de los demás elementos se mantienen. En cuanto al perfil térmico, el único cambio fue el ascenso a 69 °C de la temperatura de hibridación. Estas condiciones se aplicaron en la amplificación mostrada en la figura 6.10.

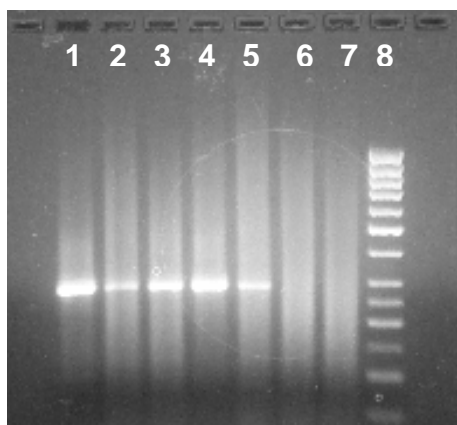


Figura 6.10 Amplificación con imprimadores OLI-1 y Y-2, utilizando la mezcla de reacción y el perfil térmico final para la detección a nivel de especie. Carril 1. Control positivo CIP#88; 2 y 3. Planta Ts-01, 10 ng y 50 ng respectivamente; 4. Lisis de exudado bacteriano planta Ts-01; 5. Lisis de aislamiento finca 1 Sarchí por el método de exudado; 6 y 7. Controles negativos; 8, Marcador de peso 50 bp

6.4.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa para la detección del biovar 2 de *R. solanacearum*

Se demostró que los imprimadores B2-I-F y B2-II-R son efectivos para detectar la presencia del biovar 2 entre muestras de varios biovares, ya que bajo las mismas condiciones, sólo las muestras que presentaban el biovar 2 mostraron la banda esperada de 68 bp (figura 6.11).

En cuanto a la concentración de los imprimadores se logró establecer que a una concentración de 0,66 μM la amplificación de los controles positivos mejoró considerablemente, sin embargo junto con este efecto aparecieron amplificaciones inespecíficas de bajo peso molecular, cuya migración fue muy similar a la banda esperada de 68 bp por lo que produjo confusión en la interpretación.

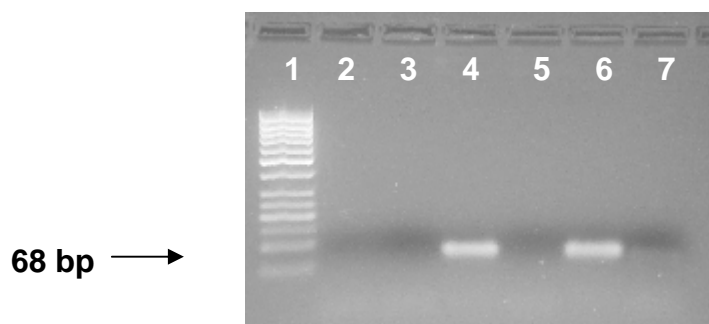


Figura 6.11 Amplificación con imprimadores B2-I-F y B2-II-R para los controles positivos de *R. solanacearum* suministrados por el CIP. Carril 1. Marcador de peso 50 bp; 2. CIP# 6; 3. CIP#66; 4. CIP#88; 5. CIP#90; 6. CIP#95; 7. Control negativo.

Estas bandas inespecíficas de bajo peso molecular también se pudieron observar en algunas amplificaciones cuando se usaron los imprimadores a 0,33 μM , pero con menor frecuencia.

La adición de BSA trajo consigo un efecto negativo sobre la amplificación inhibiendo completamente la reacción, lo que se demostró por la ausencia de amplificación en los controles positivos.

En cuanto a la cantidad de ADN ideal para la reacción, se estableció que las cantidades probadas no muestran ninguna diferencia más que en la intensidad de la banda que se produce. Lo cual se pudo demostrar al llevar a cabo diferentes diluciones de la extracción de ADN del cultivo bacteriano correspondiente al control positivo ICMP# 8049 (figura 6.12).

Otro aspecto que se evaluó fue la temperatura de hibridación de los imprimadores. Se obtuvo de forma general que cuando se aumenta la temperatura de hibridación disminuye la presencia de amplificaciones inespecíficas de bajo peso molecular (figura 6.13). Este aspecto también se ve afectado por otras condiciones como concentración de reactivos en la mezcla de reacción. Por tanto el aumento de la temperatura de hibridación funciona siempre y cuando se mantengan intactas las demás condiciones.

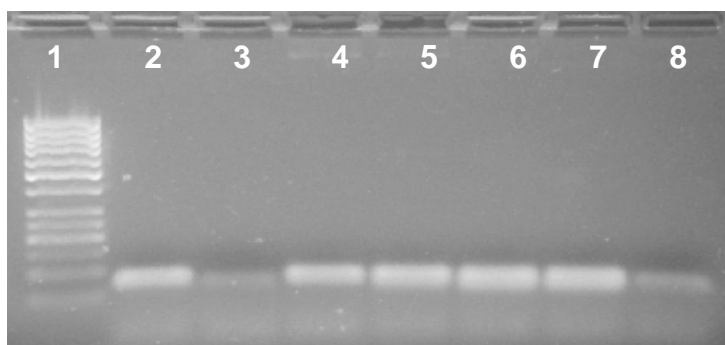


Figura 6.12 Amplificación de ADN con imprimadores B2-I-F y B2-II-R mostrando diferentes concentraciones de ADN blanco de la muestra ICMP#8049. Carril 1. Marcador de peso 50 bp; 2. Control positivo CIP#88; 3 y 8. Controles negativos; 4, 5, 6 y 7. Control positivo ICMP# 8049: 100 ng, 50ng, 25ng y 10 ng respectivamente.

Se estableció que la mejor concentración de Cloruro de Magnesio es de 3,5 mM ya que la concentración de 2,5 mM promueven la aparición de amplificaciones inespecíficas de bajo peso molecular y la concentración de 1,5 mM provocan que no se dé la amplificación (figura 6.14).

En el análisis de las muestras de plantas de tomate de Yas de Cartago y las de la finca 1 de Sarchí; aislamiento de finca 1 de Sarchí por el método de exudado y la lisis del exudado propiamente de planta Ts-01. Ninguna de ellas concordó con los controles positivos, mostrando la banda esperada de 68 bp, lo cual demuestra que no pertenecen al biovar 2. Vale señalar que sólo se analizaron las muestras.

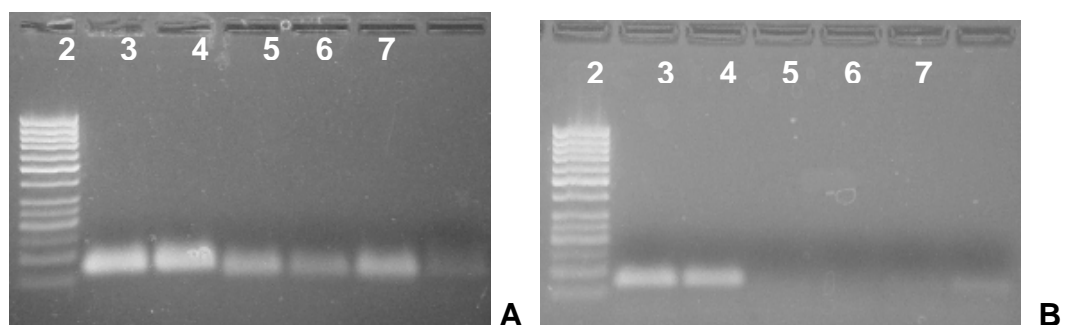


Figura 6.13 Amplificación de ADN con imprimadores B2-I-F y B2-II-R mostrando diferentes temperaturas de hibridación de los imprimadores. A. 68 °C. B. 70 °C. En ambos casos las mezclas de reacción son idénticas y las muestras son las mismas. Carril 1. Marcador de peso 50 bp; 2 y 3. Controles positivos CIP# 88 y 95 respectivamente; 4 y 5. Controles negativos CIP# 6 y 66 respectivamente; 6. Planta Ts-01; 7. Control negativo de reacción.



Figura 6.14 Amplificación de ADN con imprimadores B2-I-F y B2-II-R mostrando diferentes concentraciones de Cloruro de Magnesio. Carril 1 y 2. Controles positivos CIP# 88 y 95 respectivamente; 3 y 4. Controles negativos CIP# 6 y 66 respectivamente; 5. Control positivo ICMP# 8049; 6. Control negativo de reacción (todas las anteriores con una concentración de Cloruro de Magnesio de 1,5 mM); 7. Marcador de peso 50 bp; Carriles 8-13 muestras en el mismo orden que de 1-6 pero con una concentración de Cloruro de Magnesio de 3,5 mM.

7. DISCUSIÓN

7.1. Análisis de los síntomas de las plantas muestreadas

Los datos arrojados al examinar las plantas de geranio muestreadas nos indicarían en principio la presencia de la enfermedad “marchitez bacteriana del Sur”. En esta enfermedad la bacteria *R. solanacearum* se encarga de provocar un fuerte daño a toda la planta. La infección en la planta puede darse típicamente empezando a través de las raíces, dañando zonas radicales y procesos como el crecimiento de raíces secundarias. Una vez dentro de la planta, la bacteria se multiplica y se mueve por el tejido vascular en un proceso que se acelera con altas temperaturas, la colonización depende de la parte de la planta que este siendo colonizada. El siguiente paso es la colonización del xilema, donde la bacteria se adhiere a las paredes de los vasos o invade el lumen. Estando aquí se adhiere por medio de una atracción polar a la superficie de las células y seguidamente llega a localizarse en sus sitios preferidos del mesófilo. Aquí se encarga de bloquear los vasos lo cual se convierte en la principal causa de la marchitez (CABI, 2003).

Según Kim y Olson (2003), el principal síntoma de esta enfermedad es la marchitez, sin embargo puede venir acompañado de efectos secundarios como el amarillamiento general en las hojas y una necrosis en forma de “V”. De manera que según lo mostrado por las plantas muestreadas se podría decir que existe la posibilidad de que estén afectadas por la bacteria, más esto no es seguro debido principalmente a que en ninguna de las plantas se observó la marchitez que provoca en la hoja de geranio una forma de sombrilla.

A esta discusión se suma el hecho de que esta enfermedad tiende a confundirse con otras enfermedades que de la misma forma atacan al geranio. Por ejemplo, la infección con *Xanthomonas* provoca marchitez y el efecto de sombrilla en las hojas, sin embargo la bacteria produce unas pequeñas manchas en las hojas cosa que no la produce *R. solanacearum* (Whipker, 2003).

Además la infección por *Botrytis* en geranio generalmente produce en las hojas una necrosis en forma de “V” similar a la producida por *Ralstonia* diferenciándose únicamente por la presencia de esporas. También hay que destacar que las plantas de geranio son sumamente sensibles al estrés hídrico, por lo que, bajo un régimen de deficiencia de agua estas plantas suelen mostrar síntomas de marchitez y amarillamiento de las hojas (Whipker, 2003).

Con todo lo discutido queda claro que el diagnóstico de esta enfermedad no se puede llevar a cabo simplemente analizando sus síntomas, es necesario por tanto llevar a cabo las demás pruebas y en base a los resultados se puede dar el resultado de forma global y más precisa (Directiva del consejo UE, 1998).

Las plantas de tomate muestreadas indican que también en esta especie se podrían presentar problemas de diagnóstico a nivel de síntomas. Las muestras tomadas del Yas de Cartago y de la finca 1 de Sarchí mostraron síntomas muy parecidos con una marchitez generalizada en toda la planta que se da en un tiempo muy corto y que hace que la mayoría de sus hojas decaigan de un momento a otro manteniendo su coloración verde.

Gabor y Wiebe (1997) afirman que los síntomas de una típica infección por *R. solanacearum* en tomate empiezan con la caída de las hojas basales seguido de la marchitez total de la planta. Además estos autores indican que el amarillamiento foliar no está relacionado con esta enfermedad.

De manera que las plantas muestreadas en la finca 2 de Sarchí, no cumplirían con los síntomas descritos para esta bacteria, ya que según los resultados las plantas de esa finca mostraron un amarillamiento muy localizado, con presencia de lesiones secas y con una marchitez en general muy débil. Sin embargo estos aspectos no son suficientes para asegurar el diagnóstico y más bien es obligatorio realizar las otras pruebas para descartarlo totalmente (Jones *et al.*, 1991).

7.2. Pruebas preliminares para la detección de *R. solanacearum*

7.2.1. Prueba de exudación del tallo

La prueba de exudación del tallo, aunque resultó ser una de las más sencillas, mostró que sus resultados son determinantes en el diagnóstico de la enfermedad y causada por la bacteria *R. solanacearum*.

Según la Directiva del consejo UE (1998) en su diario oficial, este fenómeno no se produce con ninguna otra bacteria que cause infecciones vasculares en las plantas de papa o tomate.

Lo que ocurre en esta prueba es que al cortar el tallo en su parte basal y hacer otro corte un poco más arriba, el segmento de tallo pierde todo tipo de equilibrio hídrico por lo que por un efecto más de osmosis el agua sube dentro del segmento a través de los haces vasculares y las bacterias que se concentran más en esa zona al presentar mayor densidad tienden a bajar. Esto no se da con otras bacterias porque su ubicación dentro de la planta y de los tejidos es diferente (Elphistone *et al.*, 1996).

De forma general este es un método que descarta de forma categórica la presencia de un hongo, debido a que estos nunca producirán el efecto de hilar la sustancia lechosa en agua, aún cuando se ubiquen en el sistema vascular. Sin embargo una relación directa entre los síntomas y ésta prueba debe ser establecida, y si es posible llevar a cabo el resto de pruebas confirmatorias para descartar cualquier error (Jones *et al.*, 1991).

La experiencia en un laboratorio de diagnóstico como el del Ministerio de Agricultura y Ganadería de Costa Rica, indica que esta prueba lleva en gran medida el peso del resultado. En este tipo de laboratorios obligados a brindar un resultado en forma rápida y precisa se ha establecido que *R. solanacearum* es la única que produce este efecto por lo menos entre las bacterias fitopatógenas que son analizadas en este laboratorio^{*},

De esta forma se puede decir de forma previa, antes de entrar en las pruebas confirmatorias sobre todo la de PCR que es la que interesa en el presente trabajo se diría que únicamente las plantas de tomate del Yas de Cartago y de la finca 1 de Sarchí presentan la bacteria *R. solanacearum*.

7.2.2. Aislamiento de *R. solanacearum* en medio de cultivo

Los medios de cultivo son sustratos artificialmente creados para poder mantener un determinado microorganismo en condiciones axénicas en un laboratorio para mayor facilidad de manejo y estudio (Madigan *et al.*, 1999).

Debido a los requerimientos nutricionales de cada uno de los organismos patógenos, algunos de los medios de cultivo y técnicas utilizadas para su diagnóstico pueden servir para varios de ellos, pero otros han sido desarrollados para ser utilizados únicamente con una especie de patógeno, e incluso con una sola variante o raza de la misma, es así como reciben la denominación de medios selectivos o específicos (Engelbrecht, 1994).

^{*} VILLALOBOS, J. 2005. Diagnóstico de *R. solanacearum*. (Comunicación personal)

De manera general un medio de cultivo debe contener los elementos básicos que le permitan a cualquier microorganismo su sobrevivencia. Entre estos elementos podemos citar los macronutrientes como el carbono, fósforo, azufre, potasio, magnesio, sodio y hierro. También debe proporcionar micronutrientes como el manganeso o el zinc. Un medio de cultivo que contenga los elementos mínimos será un medio de cultivo general y permitirá el crecimiento de la mayoría de los microorganismos (Madigan *et al.*, 1999).

La selectividad de un medio de cultivo empieza a la hora de analizar el metabolismo propio de cada grupo de microorganismo. Esto puede conducir a tener que quitar ciertos elementos o en otros casos agregar otros. El principal mecanismo para crear un medio de cultivo selectivo es por medio de la adición de antibióticos que inhiben el crecimiento de muchos microorganismo excepto el que nos interesa (Engelbrecht, 1994).

Los medios YPGA y King B, usados en el presente trabajo para el aislamiento de la bacteria *R. solanacearum* tienen la desventaja de permitir el crecimiento de una amplia gama de bacterias. Por lo que es normal que aparezcan bacterias que no corresponden a la bacteria que interesa (Directiva del consejo UE, 1998).

En estos casos es de suma importancia regular condiciones como la temperatura y el pH que en dado caso podrían aumentar la selectividad del medio. De todas formas, cuando aún sigan creciendo bacterias que no son las que interesa es determinante analizar detalladamente las características de la colonia, pues una clara distinción de la colonia permite su posterior purificación (Madigan *et al.*, 1999).

Un elemento que podría causar un aumento en la aparición de bacterias no deseadas en el medio de cultivo, es el método que se use para su aislamiento.

El material que se usa para el aislamiento por lo general viene del campo, donde está expuesto a toda clase de microorganismos. Cuando la planta es trasladada al laboratorio estos microorganismos sobre todo saprofitos se encuentran en la planta y posiblemente sean inoculados en la placa.

El primer método que se utilizó para el aislamiento de la bacteria fue a base de la maceración de tejido afectado seguido por la dilución y la extensión en placa. En este sentido es muy importante el paso en el que se lava el material con abundante agua y jabón, aquí se elimina la materia orgánica que es de esperar que esté cargada de microorganismos (Stead, 1992a).

Luego es muy importante que los segmentos que se cortan no contengan daños muy avanzados ya que es probable que la presencia de saprófitos sea mayor. Además los lavados con cloro y agua juegan la función de eliminar los pocos saprófitos que quedarán en la superficie del materia.

La intención al macerar el material es que las bacterias que en teoría se encuentran dentro del tejido sean liberados al medio y al llevar a cabo diluciones seriadas se pretende obtener colonias aisladas que permitan su análisis y su posterior purificación.

En el segundo método de aislamiento usando el exudado bacteriano es de vital importancia en primer lugar lavar el material que se vaya a usar, esto reduciría la cantidad de saprófitos. También hay que cuidar que el agua sea lo más limpia posible y que la prueba se lleve a cabo bajo las condiciones de mayor asepsia posible (Stead, 1992a).

En ambos métodos una de las fases más críticas es cuando se inocula en la placa. Se recomienda que esta fase sea realizada en un cámara de flujo laminar, ya que de otra forma la simple exposición de la placa al aire provoca que muchos organismos no deseados aparezcan en la placa.

Comparando los medios de cultivo YPGA y King B se puede decir que ambos pueden cumplir con la función de aislar la bacteria, pero así mismo ambos medios de cultivo permiten el crecimiento de otros microorganismos sobre todo bacterias.

Comparando los métodos de aislamiento se puede afirmar que la probabilidad de aislar la bacteria usando el método de exudado es mucho mayor que cuando se usa el método de maceración. Esto tomando en cuenta que si se toma el exudado existe una prueba visual de que la bacteria está presente y en una buena concentración, mientras que por el otro método depende de la concentración que presente la bacteria en la hoja. En cuanto a la presencia de saprófitos, usando adecuadamente la técnica del exudado se pueden eliminar estos microorganismos ya que no se da la inoculación del material vegetal en la placa (Engelbrecht, 1994).

En este sentido la identificación de la bacteria es un poco complicada. Sin embargo, una comparación entre las posibles colonias del patógeno versus las colonias que presenta un control positivo ayuda a desechar algunas colonias que difieren de esas características y permite que colonias que comparten ciertas características sean evaluadas por otras pruebas para confirmar si se trata o no de la bacteria que interesa.

El otro medio de cultivo (TZC) usado para purificaciones brinda una idea más precisa en la identificación del patógeno. Esto porque la adición de Cloruro de Trifenil Tetrazolio (TZC) a este medio hace posible que al ser metabolizado por la bacteria se produzca formazán, una sustancia de color rojiza que se distingue claramente en el medio de cultivo. No todas las bacterias tienen la capacidad de metabolizar el TZC, por lo cual las colonias son claramente distinguibles (Engelbrecht, 1994).

La observación de las colonias aisladas vino a reforzar lo comprobado hasta el momento en los demás medios de cultivo y en las pruebas anteriores, ya que fueron las mismas colonias que anteriormente concordaron con el control positivo en este medio.

Un aspecto importante del medio TZC es que brinda una idea de la patogenicidad de la bacteria, cosa que no es posible en los demás medios de cultivo. Esta bacteria tiende a perder muy rápido la patogenicidad cuando se encuentra en medio de cultivo y es por esto que poder monitorearlo visualmente es de suma importancia. Se reporta que conforme la bacteria muestra colores más claros que se acercan al rosado es porque están perdiendo su capacidad patogénica (Stead, 1992a).

Entonces según los resultados obtenidos, solamente el control positivo conservaría la patogenicidad, mientras que el resto de cultivos aislados casi no podrían sobrevivir en un sustrato natural. Esto se explica principalmente por el hecho de que los primeros aislamientos estaban muy contaminados y fue necesario llevar a cabo varias purificaciones, lo que significó un subcultivo y cada uno de estos fue disminuyendo esa capacidad invasiva.

7.2.3. Montaje al microscopio y tinción de bacterias aisladas

El grupo taxonómico al que pertenece la bacteria *R. solanacearum* se caracteriza por ser un grupo de bacilos rectos o ligeramente curvados con flagelación polar. Además son Gram negativos quimioorganotróficos aeróbicos que no muestran nunca metabolismo fermentativo (CABI, 2003).

Existen ciertos elementos que permiten distinguir esta bacteria en un microscopio. En primer lugar hay que observar la forma, *R. solanacearum* es un bacilo; luego hay que tomar en cuenta que esta bacteria posee varios flagelos, estos flagelos le dan la capacidad de movimiento (Jones *et al.*, 1991).

Otros elemento es la tinción, esta bacteria es Gram negativa o sea, tiene una pared celular bastante compleja compuesta por la membrana plasmática, un espacio periplásmico, una pequeña capa de peptidoglicano y una capa externa de lipopolisacárido. Al tener una pequeña capa de peptidoglicano esto no evita que el decolorante de la tinción gram entre y disuelva los cristales que forma el cristal violeta. Al agregar la safranina la bacteria se tiñe de rojo (Madigan *et al.*, 1999).

De manera que una forma de abreviar el proceso es agregando únicamente safranina, aunque se sabe que las bacterias gram positivas también se verían rojas. Pero para efectos de poder observarlas al microscopio la utilización del colorante es válida para provocar el contraste. El otro elemento importante en la identificación de la bacteria es la observación de los gránulos de Ácido Poli- β -Hidroxibutírico (PHB). Estos gránulos son inclusiones de un compuesto lipídico que consta de unidades de ácido hidroxibutírico. Los monómeros de este ácido se unen por enlaces ester formando un largo polímero (Directiva del consejo UE, 1998).

Las inclusiones de PHB pueden ser observadas al microscopio por medio de dos colorantes: el Negro Sudán y el Azul de Nilo. Estos dos colorantes tiñen específicamente estas inclusiones, en el caso del Azul de Nilo se verán color naranja fluorescente brillante en un microscopio de fluorescencia y en el caso del Negro Sudán se verán de color negro azulado en un microscopio óptico (Madigan *et al.*, 1999).

De manera que aunque existan varios elementos característicos de *Ralstonia* la simple observación al microscopio no es un método que brinde de forma concreta un diagnóstico. Más aún lo mejor que se puede hacer es llevar a cabo un montaje de un control positivo del cual se tenga certeza su identidad. A la hora de analizar las muestras o aislamientos bastará con comparar entre el control y la muestra bajo las mismas condiciones y al menos desechar las que no compartan características y a las que si compartan practicarles otras pruebas confirmatorias (Directiva del consejo UE, 1998).

Precisamente esto fue lo que se practicó con las diferentes colonias aisladas a partir de las plantas muestreadas, el resultado indicó que en los aislamientos existían 3 tipos de bacterias de acuerdo principalmente al tamaño. Las bacterias mostraron forma bacilar y se tiñeron de rojo. De manera que al final las que concordaron con el tamaño del control fueron las que se tomaron como posibles colonias de *R. solanacearum*.

7.2.4. Prueba rápida con el kit Agdia® ACL® - Rs inmunostrip para la detección de *R. solanacearum*

Para el caso de muestras de plantas los resultados obtenidos mediante esta prueba sirvieron para confirmar los resultados obtenidos en la prueba de exudación del tallo, demostrando concordancia tanto en las muestras positivas como en las negativas.

Para el caso de muestras de cultivo bacteriano los resultados de esta prueba confirmaron los resultados previos obtenidos con el montaje al microscopio.

Otra forma de verlo es como un ELISA reducido y con menos sensibilidad. Entre las limitaciones que se le atribuyen a estas pruebas están que las muestras vegetales deben estar lo más limpio posible porque de lo contrario puede inhibir la reacción. Además las muestras de cultivos bacterianos deben contener una concentración de bacterias por arriba de las 10^6 ufc/ml, de no ser así el resultado será negativo (French *et al.*, 1995).

Además problemas de almacenamiento de los “kits” o de mala lectura de las pruebas pueden conllevar a cometer errores en el diagnóstico

7.3. Aislamiento y cuantificación de ADN de las muestras analizadas

7.3.1. Aislamiento de ADN de tejido vegetal

El aislamiento de ADN es una etapa crítica en aplicaciones moleculares, ya que en estos casos se requiere de ADN de excelente calidad. La capacidad de obtener ADN puro de alto peso molecular depende en gran medida del protocolo utilizado para la extracción

En estudios de diagnóstico molecular de enfermedades la necesidad de obtener ADN en buenas cantidades y de excelente calidad es mayor, ya que el ADN del organismo que se va a diagnosticar se encuentra en menor proporción en relación con el de la planta.

En este sentido los *kits* comerciales brindan una oportunidad sobre todo en el aspecto de facilidad de manejo y reducción de la contaminación y exposición a reactivos altamente dañinos. Sin embargo la calidad de los *kits* varía mucho por lo que se debe tener cuidado a la hora de elegir uno de estos (Poussier *et al.*, 2002).

El *kit Wizard* de Promega® mantiene un esquema general de un proceso de aislamiento de ADN. En primer lugar la maceración del tejido es de vital importancia para ir liberando un poco las moléculas y facilitar la labor que pueda llegar a hacer la solución de lisis. Esta solución lo que hace principalmente es romper las membranas y paredes celulares liberando al medio todos los componentes celulares, este proceso se ve ayudado por la temperatura.

La adición de ARNasa y la solución de precipitación de proteínas es terminar de separar las moléculas que componen las células. La solución de precipitación de proteínas separará todas las proteínas de los ácidos nucleicos y la ARNasa precipitará todo el ARN dejando solo al ADN en la fase superior en una forma bastante pura (Poussier *et al.*, 2002).

La precipitación con isopropanol y el posterior lavado con etanol, son pasos que también se incluyen en la mayoría de los protocolos de aislamiento de ADN. El efecto que hace que el ADN precipite en presencia de isopropanol es de deshidratación, ya que las fuerzas que mantiene en ADN con el solvente llegan a ser menores que las fuerzas que mantiene el isopropanol con ese mismo solvente. Esta precipitación se ve favorecida con la centrifugación (Klug y Cummings, 1999).

Las cantidades de ADN obtenidas usando este “*kit*” variaron mucho de una muestra a otra, esto puede deberse a varios factores. Puede ser que el material de origen no haya sido macerado de forma uniforme en todas las muestras. Además no se descarta que se haya cometido errores en la ejecución del protocolo.

Los resultados demuestran que los cambios al protocolo mejoraron en gran medida la cantidad de ADN extraído. El principal cambio fue aumentar el tiempo de las centrifugaciones. Esto demuestra que el protocolo originalmente está diseñado para obtener calidad y no cantidad, ya que al aumentar los tiempos de centrifugación existe mayor probabilidad de que precipite más ADN, pero de la misma forma precipitarán más sustancias contaminantes sobre todo proteínas (Klug y Cummings, 1999).

De cualquier forma el ADN obtenido siempre mostró buenos resultados en las amplificaciones, incluso en aquellas extracciones cuyas cuantificaciones mostraron cantidades de ADN de 0 ng/ul. Este hecho se explica diciendo que aunque no pudo ser cuantificado en estas muestras si se obtuvo ADN y de buena calidad.

El hecho de que este ADN no fuera cuantificado se puede deber a que la dilución de la cuantificación fue muy elevada, mala calibración del cuantificador o contaminación del blanco con pequeñas cantidades de ADN lo cual al tarar a cero elimina la absorbancia que pudieran presentar las muestras.

En cuanto a las extracciones de ADN de cultivos bacterianos, el “*kit*” resultó ser más efectivo. Los resultados demuestran que las cantidades de ADN obtenidas de cultivos bacterianos fue relativamente más alta que la obtenida a partir de planta. La principal causa de esto podría ser el hecho de que en el caso de las bacterias no hay que disolver ningún tipo de tejido, además los tiempos de centrifugación son mayores a lo que se le suma el hecho de que la temperatura de lisis es 15 °C mayor.

Para terminar, la lisis bacteriana mostró resultados muy positivos, tanto a partir de las colonia como del exudado. En ambos casos el efecto es el mismo, el calor hace que se degraden las paredes celulares y el contenido celular entre este el ADN es liberado al medio. En este caso una centrifugación podría mejorar la pureza al precipitar componentes celulares, pero los hechos demostraron que esto no es necesario y que basta con la lisis para obtener una buena amplificación (Klug y Cummings, 1999).

7.4. Diagnóstico Molecular de *R. solanacearum*

7.4.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección de la especie *R. solanacearum*

Los resultados obtenidos con los imprimadores OLI-1 y Y-2, sugieren la capacidad de los mismos para detectar a nivel molecular la especie *R. solanacearum*. Además la amplificación de los diferentes controles del CIP sugieren que el biovar que presente la bacteria no presenta diferencias en cuanto a la amplificación. Los biovares 1, 2, y 3 que se probaron mostraron la banda de 288 bp esperada.

La especificidad de los imprimadores se ve demostrada al llevar a cabo un análisis con la herramienta BLAST del NCBI. En este análisis se demostró que la secuencia del imprimador OLI-1 no tienen secuencias complementarias con ningún otro organismo de los que se encuentran en su base de datos.

El alineamiento de esta secuencia mostró concordancia con todas las cepas de *R. solanacearum* y sinónimos presentes en la base de datos. Según lo mostrado la secuencia de este imprimador alinea en un 100% de sus bases con un segmento dentro de la secuencia del gen ARN 16S. En cuanto al imprimador Y-2 se encontró una especificidad similar, con la diferencia de que alineaba parcialmente con secuencias de otros microorganismos presentes en la base de datos. Esto demuestra que este imprimador cumple una función de flanquear la región que interesa. Sin embargo sigue siendo específico para la especie.

Al buscar alinear las secuencias de los dos imprimadores dentro de la base de datos se logró predecir de forma digital la secuencia del segmento amplificado. Este segmento se puede observar en el anexo 11, haciendo énfasis en el hecho de que en los datos generados en este análisis el segmento amplificado tiene una longitud de 285 bp, cuando lo que se reporta es 288 bp.

Diversos métodos de detección molecular, han sido reportados para esta bacteria. De todos parece que la Reacción en Cadena de la Polimerasa es que tiene mayor aceptación. El desarrollo de una amplia gama de imprimadores específicos para esta bacteria ha llevado a investigadores a discutir sobre cuáles son los mejores (McGregor *et al.*, 1996).

En la mayoría de los casos los autores indican que los imprimadores cumplen debidamente su función. Por ejemplo, Caruso *et al.* (2003) concluyen que usar la combinación de imprimadores OLI-1, OLI-2 y JE-2 en un método conocido como Co-PCR brinda una alta especificidad y sensibilidad en el ensayo, tanto que hace posible la detección de pequeñas concentraciones de la bacteria en agua.

Por otro lado, Pradhanang *et al.* (2000) llevaron a cabo una comparación entre un PCR convencional usando los imprimadores OLI-1 y Y-2 y un PCR anidado usando los imprimadores OLI-1, OLI-2, JE-2 y Y-2 en muestras de suelo. Ellos concluyeron que el PCR anidado brinda una mayor sensibilidad y previene inhibiciones que puedan darse con el PCR convencional.

Los resultados obtenidos demuestran que la técnica de PCR convencional cumplió su objetivo, esto porque el objetivo principal es el diagnóstico a nivel de biovar 2 y ninguno de los métodos antes mencionados aunque sean más sensibles logran tal tarea (McGregor *et al.*, 1996).

Además hay que destacar que se está trabajando en una institución encargada de la seguridad fitosanitaria del país. Por lo tanto se debe cumplir al máximo con las exigencias que se piden a nivel mundial. En el Anexo 9 se señalan los imprimadores que han sido reconocidos por la EPPO para llevar a cabo un diagnóstico molecular de la bacteria *R. solanacearum*. Ahí se mencionan los imprimadores OLI-1 y Y-2 por lo que en un conflicto a nivel fitosanitario este diagnóstico sería válido (EPPO, 2004).

Las muestras analizadas arrojaron resultados que respaldan las pruebas anteriormente realizadas. Las muestras vegetales de plantas de tomate del Yas de Cartago y de la finca 1 de Sarchí mostraron la banda de 288 bp, mientras que las muestras de geranio de Agua Caliente de Cartago mostraron resultados negativos. Estos datos son consecuentes con la prueba de exudación del tallo y con los resultados obtenidos con el *kit Immunostrips*.

Las muestras provenientes de aislamientos en medio de cultivo por el contrario no brindaron datos consecuentes con la prueba *kit Immunostrips* al menos en uno de los casos. La colonia aislada de las plantas provenientes del Yas de Cartago por el método de maceración y que presentó morfología similar al control positivo y además fue positiva con el *kit Immunostrips* no mostró la banda esperada en la amplificación.

Según Roncal *et al.* (1999) la bacteria *R. solanacearum* muta con mucha frecuencia y en corto tiempo cuando se encuentra cultivada en el laboratorio. Este es el motivo por el cual la bacteria puede que conserve los antígenos que hacen posible su detección en la prueba rápida pero que su material genético haya variado en tal proporción que su detección a nivel molecular no fue posible. Sin embargo esto es sólo una especulación y lo mejor sería validar los resultados del *kit*.

En cuanto a la estandarización de la amplificación hay que decir que tres elementos básicos permitieron la optimización de la reacción. A destacar: la disminución en la concentración de los imprimadores, la adición de BSA y el aumento de la temperatura de hibridación.

Disminuir la concentración de los imprimadores a la mitad trajo consigo una marcada disminución en la aparición de amplificaciones inespecíficas de bajo peso molecular. Se dice que existen muchas posibles causas para la aparición de estas bandas.

La primera se conoce como dimerización de imprimadores. Harris (1998) expresa que los dímeros de imprimadores son pequeños productos de 40-50 pares de bases que se forman por la hibridación de los imprimadores completa o incompletamente y la subsecuente extensión por la ADN polimerasa. El mismo autor afirma que disminuir su concentración y analizar cuidadosamente la secuencia de los imprimadores son tareas que ayudan a evitar el fenómeno.

La aparición de estas bandas de bajo peso molecular también se puede deber a un efecto conjugado entre hibridaciones inespecíficas de los imprimadores en zonas que no son blanco y contaminación por ADN foráneo. En este caso lo mejor es cerciorarse que los imprimadores sean completamente específicos y aplicar medidas que minimicen la contaminación como por ejemplo separar las áreas del laboratorio.

La temperatura de hibridación es un factor de suma importancia en PCR, está relacionada con dos aspectos: la naturaleza de los imprimadores y la cantidad de ADN blanco. Entre mayor sea la longitud de los imprimadores mayor deberá ser su temperatura de hibridación, además si esos imprimadores tienen un alto porcentaje de GC también se elevará esta temperatura. Así mismo entre mayor sea la cantidad de ADN blanco que se pone en la reacción mayor deberá ser la temperatura de hibridación.

El aumento en la temperatura de hibridación provoca que únicamente se unan secuencias que son complementarias en su totalidad evitándose así la dimerización de imprimadores y la hibridación con regiones del ADN que no son blanco (Wilson, 1997).

La adición de BSA a la mezcla de reacción demostró tener efectos importantes en la prevención de inhibiciones en la amplificación. Poussier *et al* (2002) demostró al igual que este trabajo que la adición de BSA permite la amplificación de muestras de sustratos naturales que usualmente presentan problemas de inhibición. Se cree que lo que hace el BSA es interactuar con sitios activos secundarios de la ADN polimerasa por lo que la enzima no se ve afectada por los elementos externos a la reacción lo que permite que la amplificación se de sin problemas (Kreader, 1996).

7.4.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa para la detección del biovar 2 de *R. solanacearum*

En este trabajo se logró establecer que los imprimadores B2-I-F y B2-II-R pueden detectar de manera específica la bacteria *R. solanacearum* biovar 2. Se comprobó porque en los controles enviados por el CIP únicamente las cepas con el biovar 2 mostraron la banda de 68 bp esperada mientras que las cepas de los otros biovares no mostraron esa banda.

No existen muchos reportes acerca del uso de estos imprimadores para la detección específica del biovar 2. Únicamente dos autores reportan su uso Weller *et al.* (2000) llevaron a cabo una adaptación de un protocolo descrito por Mark Fegan en 1998 para usar estos imprimadores en un protocolo de PCR en tiempo real. Mientras tanto Willianson *et al.* (2002) adaptaron el protocolo descrito por Weller para usar los mismos imprimadores en un PCR convencional. En ambos casos lograron la amplificación específica de las cepas biovar 2 únicamente.

El producto de 68 bp deriva de una región ITS altamente variable que se ubica entre los genes ADNr 16S y ADNr 23S. En un análisis de los imprimadores con la herramienta BLAST del NCBI, no se encontraron secuencias que alinearan completamente. Esto se justifica con el hecho de que ninguna de las cepas presente en esta base de datos se reporta como biovar 2. En este mismo análisis se produjeron alineamientos pero incompletos hasta de 5 bases en muchos organismo lo cual en principio no debería significar ningún problema.

El uso de estos imprimadores también se justifica con el hecho de que al igual que los imprimadores OLI-1 y Y-2 estos se encuentran reconocidos por la EPPO en la lista oficial de este organismo que se puede ver en el anexo 9.

En esta reacción las bandas inespecíficas de bajo peso molecular representaron un problema mucho mayor al que se presentó en la reacción para la detección a nivel de especie. Principalmente a la hora de interpretación de los geles ya que la banda esperada de 68 bp se debería encontrar muy cerca de una banda de 50 bp que según Harris (1998) podrían estar formando los dímeros de imprimadores.

Las causas de estas bandas pueden ser muy variadas y el hecho de que no aparezcan siempre se puede deber a que la reacción es muy susceptible a pequeños cambios en concentraciones de reactivos y a pequeños errores humanos (Harris, 1998).

Se determinó que al aumentar la concentración de los imprimadores la aparición de bandas inespecíficas de bajo peso molecular se hizo más evidente. Esto se justifica debido a la mayor probabilidad que tienen estos imprimadores de unirse entre ellos.

El aumento en la temperatura lo que provoca es que se trabaje a mayor astringencia. El concepto o nivel de astringencia con que se trabaje indica la precisión y la especificidad con que se quiere trabajar. La mayor astringencia se dará cuando la temperatura de hibridación sea igual a la temperatura de fusión (T_m) de los imprimadores, una temperatura mayor a esta imposibilitaría la unión del imprimador con su secuencia homóloga debido al exceso de energía (Harris, 1998).

Normalmente se recomienda que la temperatura de hibridación de los imprimadores sea de 5 grados menos que su T_m . En este caso las T_m de los imprimadores son 73,9 °C y 72,6 °C. Por lo que una temperatura de hibridación de 71 °C significa un alto grado de astringencia.

Pero no sólo la temperatura de hibridación y la concentración de los imprimadores podrían producir amplificaciones inespecíficas de bajo peso molecular. Este fenómeno también se puede dar por exceso de enzima ADN polimerasa, y el equilibrio entre cloruro de magnesio y nucleótidos. Además no se descarta que el diseño de los imprimadores no sea el más adecuado (McGregor *et al.*, 1996).

Los buenos resultados obtenidos al aumentar la concentración de Cloruro de Magnesio de 2,5 mM a 3,5 mM obedecen a que una mayor cantidad de este elemento propicia una mayor eficiencia en la amplificación (McGregor *et al.*, 1996).

Los resultados obtenidos en las muestras analizadas indican que las plantas que presentaron la infección con *R. solanacearum* ninguna pertenecía al biovar 2. Las muestras positivas para la detección a nivel de especie fueron de tomate, de manera que podrían pertenecer al biovar 1 o al biovar 3; ambos reportados en esta planta.

Según CABI (2003) el biovar 1 ataca las plantas de tomate provocando marchitez generalizada en toda la planta y llegando a producir la muerte total poco tiempo después de haber iniciado la infección.

En tomate se da un fenómeno que no se da en los demás hospederos y es que diferentes biovares pueden atacar esta planta. Al contrario en hospederos como el geranio solo se encontrará un biovar. Además hay que agregar que mundialmente se ha establecido que la raza 3 de esta bacteria sólo posee biovar 2 por lo que son casi sinónimos. Todo esto conduce al punto de que para el caso de geranio si se detecta la presencia del biovar 2 automáticamente se estaría detectando la raza 3 que viene dada por el hospedero en este caso el geranio (CABI, 2003).

7.5. Evaluación global del procedimiento de detección

El principal objetivo del presente estudio fue la detección del biovar 2 de la bacteria *R. solanacearum*. La ejecución de todo un proceso previo a las pruebas moleculares se llevó a cabo para tener una base y criterio que apoyará los resultados de las pruebas moleculares.

Se logró establecer una correspondencia entre los pruebas preliminares incluyendo la observación de los síntomas en el campo y los resultados de las pruebas moleculares, por lo que el método garantiza de manera más confiable el diagnóstico.

De todas las pruebas realizadas en el presente trabajo, la más sensible y la que llevará el peso del diagnóstico es la prueba de PCR, pero no hay que dejar de lado los aportes de pruebas tan sencillas como la prueba de exudación del tallo que correspondió con los resultados de PCR.

French *et al.* (1995) compararon diversos métodos de detección estableciendo como mejores técnicas el PCR y el ELISA y como peores las pruebas de aislamiento. Mientras tanto Pradhanang *et al.* (2000) en un estudio similar establecieron el PCR como la técnica más sensitiva de diagnóstico sobre todo el PCR anidado. Ellos determinaron que después del PCR la prueba de ELISA indirecto constituye una herramienta muy viable y concluyen que el aislamiento en medio de cultivo es viable siempre y cuando se combine con una técnica de detección específica y cuando se usen medios selectivos para tal propósito.

Para finalizar hay que recapitular todo el proceso de diagnóstico. La primera fase de análisis de los síntomas en el campo sirve para darse una idea acerca de la posible infección, no determina de ninguna forma el diagnóstico.

En una segunda parte las pruebas preliminares ayudarán en gran medida a fortalecer la hipótesis de la posible infección. Pruebas como la de exudación del tallo brindan una gran ayuda en el proceso de diagnóstico.

Aunque el aislamiento en medio de cultivo no siempre funciona como se quiere, siguiendo el procedimiento adecuado hará posible el estudio del microorganismo en un estado de pureza y con mayor concentración. Además en microbiología siempre se dice que el aislamiento es la prueba que indica si el microorganismo está vivo o muerto. El PCR detecta la bacteria pero no dice si está viva o muerta (Pradhanang *et al.*, 2000).

Los “kits” de diagnóstico rápido también contribuyen en el diagnóstico y por último el PCR termina de asegurar el diagnóstico de una manera casi inobjetable. Al final cuando se integran todas las pruebas el diagnóstico adquiere mucha precisión.

CONCLUSIONES

En el diagnóstico de la bacteria *R. solanacearum* deben incluirse varias pruebas de selección y al menos una prueba confirmatoria que respalde el resultado.

El mejor medio de cultivo de los usados para la identificación de colonias de *R. solanacearum* es el medio TZC. Y el mejor procedimiento para el aislamiento es utilizando el exudado bacteriano.

Los montajes al microscopio son útiles como prueba de selección rápida siempre y cuando se tenga una referencia del microorganismo.

Los resultados de las pruebas preliminares de exudación del tallo y la prueba rápida con el *kit Immunostrips* concuerdan con los resultados de las pruebas moleculares a nivel de especie por lo que el diagnóstico es más certero llevando a cabo las tres pruebas.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa usando los imprimadores OLI-1 y Y2 permite la detección molecular de la bacteria *R. solanacearum* a nivel de especie.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa usando los imprimadores B2-I-F y B2-II-R permite la detección del biovar 2 de *R. solanacearum*.

RECOMENDACIONES

Vigilar el estado de los *kits* de diagnóstico para evitar futuras confusiones con los resultados de estos *kits* esto porque se podrían estar analizando falsos positivos o falsos negativos si la calidad del *kit* no es la mejor.

Evitar los repetidos subcultivos de la bacteria porque es muy probable que la mutación sea muy frecuente.

En el caso de realizar pruebas moleculares a plantas donde no se pueda usar toda la planta y se deba usar solo hojas se recomienda tomar una muestra significativa siguiendo los parámetros establecidos por el laboratorio para elevar las probabilidades de detectar bajas concentraciones de la bacteria.

Se recomienda que el proceso de diagnóstico de esta bacteria se de en forma integral junto con el área de fitopatología y no solo el área de biología molecular.

Se recomienda estandarizar y optimizar más la amplificación a nivel de biovar 2 para evitar las bandas inespecíficas de bajo peso molecular y evitarse confusiones en la interpretación de los geles.

BIBLIOGRAFÍA.

- ANON, M. 1997. Interim testing scheme for the diagnosis, detection and identification of *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith in potatoes. Publication 97/647/EC, Official Journal European Communities. 273:1-25.
- APHIS, PPQ, 2004. New Pest Response Guidelines *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2; Southern wilt of Geranium. Editado por Joel Floyd. Riverdale, USA. USDA. 19p.
- BOUDAZIN, G.; CLAIRE LE ROUX, A.; JOSI, K.; LABARRE, P.; JOUAN, B. 1999. Design of Division Specific Primers of *Ralstonia solanacearum* and Application to the Identification of European Isolates. European Journal of Plant Pathology. 105 (4): 373-380.
- CABI. 2003. Crop Protection Compendium. Edición 2003. Wallingford, U.K. CAB International. Material Digital
- CARUSO, P.; BERTOLINI, E.; CAMBRA, M.; LÓPEZ, M. 2003. A new and sensitive Co-operational polymerase chain reaction for rapid detection of *Ralstonia solanacearum* in water. Journals of Microbiological Methods. 2003 (55): 257-272.
- COOK, D.; SEQUEIRA, L. 1994. Strain differentiation of *Pseudomonas solanacearum* by molecular genetic methods. Editado por A. Hayward y G. Hartman. Bacterial wilt: the Disease and its Causative Agent, *Pseudomonas solanacearum*. Wallingford, UK: CAB International, 77-93.
- DIRECTIVA 98/57/CE DEL CONSEJO UE. 1998. Método de diagnóstico e identificación de *Ralstonia solanacearum*. Diario Oficial de las Comunidades Europeas. España. Julio, 20: 1-30.

- DUARTE, V. 2005. Células de *Ralstonia solanacearum* com grânulos de poli-hidrobutirato após coloração com Sudan Black. Disponible en línea: <<http://www.ufrgs.br/agro/fitossan/fit35/phb.htm>>. Consultado: 6/6/05.
- DUVEILLER, E.; BRAGARD, C.; RUDOLPH, K.; FUCIKOVSKY, L. 2001. General concepts and Methods for the Identification of Pathogenic Bacteria of Wheat. USA. 20p
- ELPHINSTONE, J.; HENNESSEY, J.; WILSON, J.; STEAD, D. 1996. Sensitivity of different methods for the detection of *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith in potato tuber extracts. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. 26: 663-678.
- ENGELBRECH, M. 1994. Modification of a semi-selective medium for the isolation and quantification of *Pseudomonas solanacearum*. Bacterial Wilt Newsletter. 10: 3-5.
- EPPO. 2004. Bulletin: Diagnostic protocols for regulated pests. 34 (2): 173. Disponible en línea: <<http://www.blackwell-synergy.com/links/doi/10.1111/j.1365-2338.2004.00715.x/full/>> Consultado 10/4/2005.
- FRENCH, E. 1994. Integrated control of bacterial wilt of potatoes. CIP circular 20: 8-11.
- FRENCH, E. GUTARRA, L.; ALEY, P.; ELPHINSTONE, J. 1995. Methods for the detection of *Ralstonia solanacearum* in potato crops. Integrated Management of Bacterial Wilt. Octubre 11-16: 195p.
- GABOR, B.; WIEBE, W. 1997. Enfermedades del tomate. California, USA. Seminis Vegetable Seed Inc. 92p.

- HARRIS, E. 1998. A low cost approach to PCR. Editado por Nazreen Kadir. New York, USA. Oxford University Press. 304p
- HAYWARD, A. 1991. Biology and epidemiology of a bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Annual Rev. Phytopathology. 29: 65-87.
- HAYWARD, A. 1994. Systematic and phylogeny of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria. Bacterial wilt: The disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum*. Editado por A.C. Hayward y G.L. Hartman. CAB International Oxford. 127-135pp
- HORITA, M.; TSUCHIYA, K. 2001. Genetic diversity of Japanese strains of *Ralstonia solanacearum*. Phytopathology. 91: 399-407.
- HUDELSON, B. 1999. Southern Wilt. University of Wisconsin Garden Facts. Mayo, 11.
- JANSE, J.; VAN DEN BELD, H.; ELPHINSTONE, J.; SIMPKINS, S.; TJOU-TAM-SIN, N.; VAN VAERENBERGH, J. 2004. Introduction To Europe of *Ralstonia solanacearum* Biovar 2, Race 3 In *Pelargonium zonale* Cuttings. Journal of Plant Pathology. 86 (2): 147-155
- JONES, J.; STALL, R.; ZITTER, T. 1991. Compendium of tomato disease. Minnesota, USA. The American Phytopathological Society. 120p.
- KIM, S.; OLSON, T. 2003. *Ralstonia* wilt of geranio. Plant pathology circular. Pensilvania Dept of Agriculture. 85 (29): 1-15
- KLUG, W.; CUMMINGS, M. 1999. Conceptos de Genética. 5 edición. Traducido por José Luis Ménsua y David Bueno. Madrid, España. Prentice Hall Iberia. 840p.

- KREADER, C. 1996. Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2463-2472.
- LEE, Y.; WANG, C. 2000. The design of specific primers for the detection of *Ralstonia solanacearum* in soil samples by polymerase chain reaction. *Bot. Bull. Acad. Sint.* 2000 (41): 121-128.
- MADIGAN, M.; MARTINKO, J.; PARKER, J. 1999. Brock biología de los microorganismos. 8 edición. Madrid, España. Prentice Hall. 1064 p.
- McGREGOR, D.; FORSTER, S.; STEVEN, J.; ADAIR, J.; LEARY, S.; LESLIE, D.; HARRIS, W.; TITBALL, R. 1996. Simultaneous detection of microorganisms in soil suspension based on PCR amplification of bacterial 16S rRNA. *BioTechniques.* 21: 463-471.
- NAPPO, 2003. Normas Regionales de la NAPPO sobre medidas fitosanitarias (NRMF): requisitos para la importación de papa hacia un país miembro de la NAPO. Secretaría de la organización Norteamericana de Protección de Plantas. Ottawa, Canadá. 48p.
- OPINA, N.; TAVNER, F.; HOLLOWAY, G.; WANG, J.; LI, T.; AGHIRANG, R.; FEGAN, M.; HAYWARD, A.; KRISHNAPILLAI, V.; HONG, W.; HOLLOWAY, B.; TIMMIS, J. 1997. A novel method for development of species and strain-specific DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly *Pseudomonas solanacearum*). *Asia Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol.* 5: 19– 33.
- OVERBEEK, L.; CASSIDY, M.; KOZDROJ, J.; TREVORS, J.; VAN ELSAS, J. 2002. A polyphasic approach for studying the interaction between *Ralstonia solanacearum* and potential control agents in the tomato phytosphere. *Journals of Microbiological Methods.* 2002 (48): 69-86.

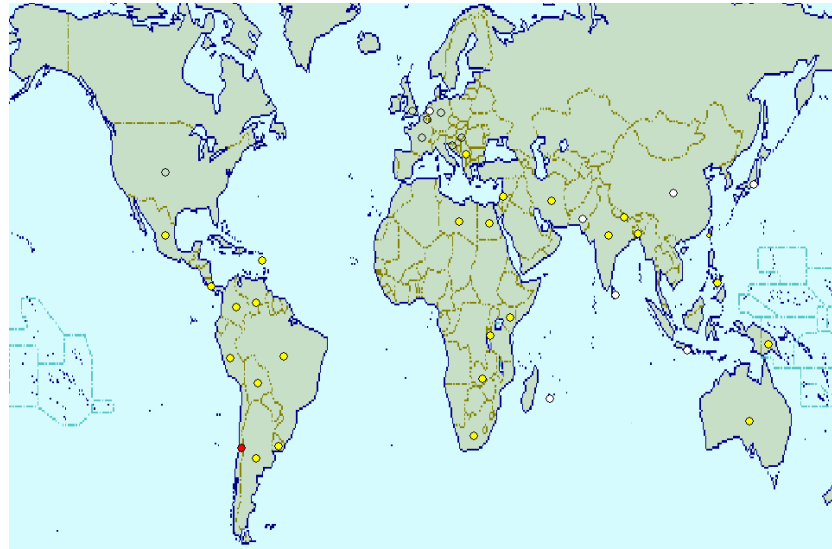
- POUSSIER, S.; LUISETTI, J. 2000a. Specific detection of biovars of *Ralstonia solanacearum* in plant tissues by nested-PCR-RFLP. Eur. J. Plant Pathol. 106: 255-265.
- POUSSIER, S.; TRIGALET, D.; VANDEWALLE, P.; GOFFINET, B.; LUISETTI, J.; TRIGALET, A. 2000b. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* as assessed by PCR-RFLP of the hrp gene region, AFLP and 16S rRNA sequence analysis, and identification of an African subdivision. Microbiology. 2000 (146): 1679-1692.
- POUSSIER, S.; CHERON, J.; COUTEAU, A.; LUISETTI, J. 2002. Evaluation of procedures for reliable PCR detection of *Ralstonia solanacearum* in common natural substrates. Journal of Microbiological Methods 2002 (51): 349– 359.
- PRADHANANG, P.; ELPHINSTONE, J.; FOX, R. 2000. Sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* in soil: a comparison of different detection techniques. Plant Pathology 2000 (49): 414-422
- ROBINSON, A.; JONES, P.; ELPHINSTONE, J.; FORDE, S. 1995. Production of antibodies to *Ralstonia solanacearum* the causative agent of bacterial wilt. Food Agric. Immunol. 7: 67-69
- RONCAL, J.; GUTARRA, L.; PRIOU, S. 1999. Rapid differentiation of strain of *Ralstonia solanacearum* by restriction analysis of PCR-Amplified fragments. Bacterial Wilt Newsletters. 1999 (16): 7-10.
- SALANOUBAD, M. 2002. *Ralstonia solanacearum* GMI 1000, Molk and 1609. Disponible en línea: <http://www.genoscope.cns.fr/externe/English/Projets/Projet_Y/organisme_Y.html>. Consultado 25/5/05.

- SCHÖNFELD, J.; HEUER, H.; van ELSAS, J.; SMALLA, K. 2003. Specific and sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* in soil on the basis of PCR amplification of fliC fragments. *Applied and Environmental Microbiology*. 69 (12): 7248-7256.
- SEAL, S.; JACKSON, L.; DANIELS, M. 1992. Isolation of a *Pseudomonas solanacearum*-specific DNA probe by subtraction hybridization and construction of species-specific oligonucleotide primers for sensitive detection by the Polymerase Chain Reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (375): 1-37.
- SEAL, S.; TAGHAVI, M.; FEGAN, N.; HAYWARD, A.; FEGAN, M. 1999. Determination of *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* rDNA subgroups by PCR tests. *Plant Pathology*. 48 (1): 115.
- STÉPHANE, G.; BOUCHER, C. 2000. *Ralstonia solanacearum*: secrets of a major pathogen unveiled by analysis of its genome. *Molecular Plant Pathology*. 3: 111–118.
- STEAD, D. 1992a. Techniques for detecting and identifying plant pathogenic bacteria. *Techniques for rapid detection of plant pathogens*. Editado por J. Duncan y L. Torres. Blackwell Scientific Publication, Oxford. 76-111p.
- STEAD, D. 1992b. Grouping of plant pathogenic and some other *Pseudomonas spp* using cellular fatty acid profiles. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 42: 281-295.
- SWANSON, J.; YAO, J.; TANS-KERSTEN, J.; ALLEN, C. 2005. Behavior of *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 during latent and active infection of geranium. *Phytopathology*. 95: 136-143.

- TANS-KERSTEN, J. HUANG, H.; ALLEN, C. 2001. *Ralstonia solanacearum* needs motility for invasive virulence on tomato. *Journal Bacteriology*. 188: 3597-3605.
- USDA, APHIS, PPQ; 2003. Pest Data Sheet, *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar2. Center for Plant Health Science and Technology. Febrero, 12: 1-20.
- VAN DER WOLF, J.; VAN BECKHOVEN, J., DE HAAN, E.; VAN DEN BOVENKAMP, G.; LEONE, G. 2004. Specific detection of *Ralstonia solanacearum* 16S rRNA sequences by AmpliDet RNA. *European Journal of Plant Pathology* 2004 (110): 25–33.
- WELLER, S.; ELPHINSTONE, J.; SMITH, N.; BOONHAM, N.; STEAD, D. 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real time fluorogenic PCR (TaqMan) assay. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2853-2858.
- WHIPKER, B. 2003. Pictorial Guide to Geranium Wilt Disorders. USA. N.C. State University Floriculture Research. 12p.
- WILLIAMSON, L.; NAKAHO, K.; HUDELSON, B.; ALLEN, C. 2002. *Ralstonia solanacearum* Race 3, Biovar 2 Strains Isolated from Geranium Are Pathogenic on Potato. *Plant Disease*. 86: 987-991.
- WILSON, I. 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1972-1974.
- YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; YANO, I.; HOTTA, H.; NISHIUCHI, Y. 1995. Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen.nov.: Proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Douderoff 1973) comb.nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. *Microbiology and Immunology*. 39:897-904.

ANEXOS

Anexo 1. Distribución Geográfica de la raza 3 de *Ralstonia solanacearum*



Fuente: CABI, 2003. Simbología:

- Presente, no se tienen muchos detalles
- Presente, diseminada totalmente
- Con reportes ocasionales, limitados a ciertas áreas

Lista de países que poseen *Ralstonia solanacearum* raza 3. CABI (2003)

Área geográfica	Países.
Norte América	Presente en México y ausente en los estados Unidos y Canadá.
Europa	Belgica, Francia, Alemania, Hungría, Holanda, España, Islas Canarias, Reino Unido y Libano. Belgica, Francia, Alemania, Hungría, Holanda, España, Islas Canarias, Reino Unido y Libano.
Asia	Bangladesh, China (Fujian, Guangdong Guangxi, Hebei, Jiangsu, Taiwan, Zhejiang), India (Himachal Pradesh, Madhya Pradesh, Maharashtra, Manipur, Meghalaya, Tamil Nadu, Tripura, Uttar Pradesh, West Bengal), Indonesia (Java), Iran, Japón (Kyushu), Nepal, Pakistan, Filipinas, Siri Lanka, Republica de Korea.
África	Burundi, Egipto, Kenia, Libia, Reunión, Sur Afrecha, Zambia
Sur América	Argentina, Bolivia, Brazil (Goias, Parana, Pernambuco, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Sao Paulo), Chile, Colombia, Peru, Uruguay
América Central y el Caribe	Costa Rica, Guadalupe
Oceania	Australia (New South Wales, South Australia, Victoria) Papua Nueva Guinea.

Fuente: CABI, 2003

Anexo 2. Información de los imprimadores OLI-1 y Y-2.

Información	Nombre	
	OLI-1	Y-2
Secuencia 5' - 3'	GGGGGTAGCTTGCTACCTGCC	CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
Temperatura de desnaturalización (T _m)	74,4° C	80,1° C
Peso Molecular, g/mol	6454	7265
Longitud	21 bases	24 bases
Adenina	2 bases	3 bases
Citosina	6 bases	10 bases
Guanina	8 bases	6 bases
Timina	5 bases	5 bases
Contenido GC	66%	66%
Escala de síntesis	0,05 µmol	0,05 µmol
Concentración	85 µM	75 µM
Fabricante	Fermentas®	Fermentas®

Fuente: Certificado de análisis Fermentas®

Anexo 3. Información de los imprimadores B2-I-F y B2-II-R

Información	Nombre	
	B2-I-F	B2-II-R
Secuencia 5' - 3'	TGGCGCACTGCACTCAAC	AATCACATGCAATTCGCCTACG
Temperatura de desnaturalización (T_m)	73,9° C	72,6° C
Peso Molecular, g/mol	5444	6663
Longitud	18 bases	22 bases
Adenina	4 bases	7 bases
Citosina	7 bases	7 bases
Guanina	4 bases	3 bases
Timina	3 bases	5 bases
Contenido GC	61 %	45 %
Escala de síntesis	0,05 μ mol	0,05 μ mol
Concentración	100 μ M	81 μ M
Fabricante	Fermentas®	Fermentas®

Fuente: Certificado de análisis Fermentas®

Anexo 4. Composición y preparación de los medios de cultivo para el aislamiento de *R. solanacearum*.

Medios YPGA

Extracto de Levadura..... 5 g
Bacto peptona..... 5 g
Glucosa..... 10 g
Bacto agar..... 15 g
Disolver en un litro de agua destilada, autoclavar y dispensar.

Medio King B.

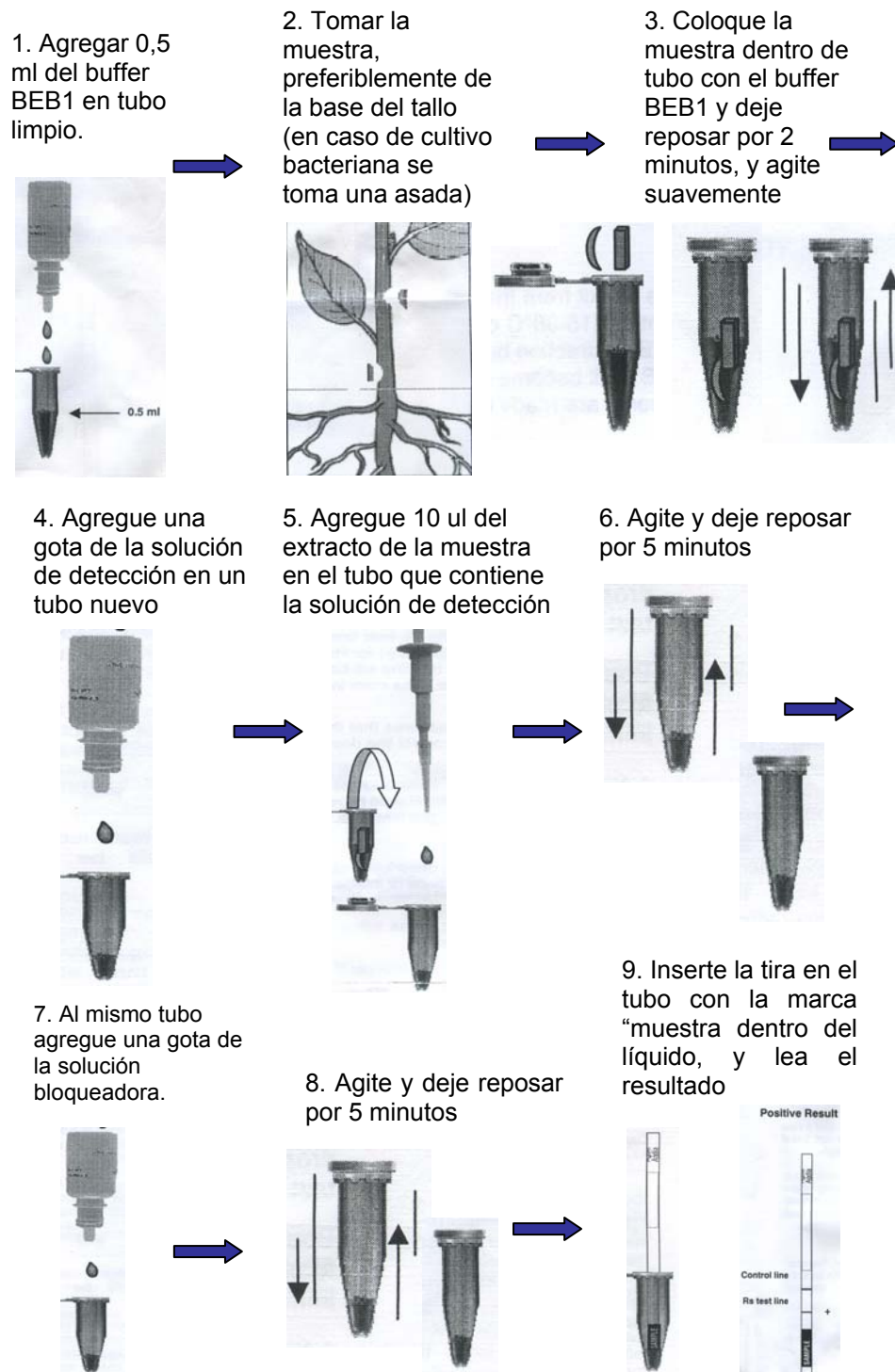
Peptona..... 20 g
Glicerol..... 10 ml
MgSO₄ * 7H₂O..... 1,5 g
K₂HPO₄..... 1,96 g
Disolver en un litro de agua destilada, autoclavar y dispensar.

Medio Tetrazolio de Kelman (TZC)

Caseína hidrolizada..... 1 g
Bacto peptona..... 10 g
Dextrosa..... 5 g
Bacto agar..... 15 g
Disolver en un litro de agua destilada, autoclavar. Simultáneamente preparar una solución de Cloruro de trifeníl-tetrazolio 10 mg/ml. Cuando el medio salga de la autoclave dejarlo enfriar y agregar 5 ml de la solución esterilizada por filtración.

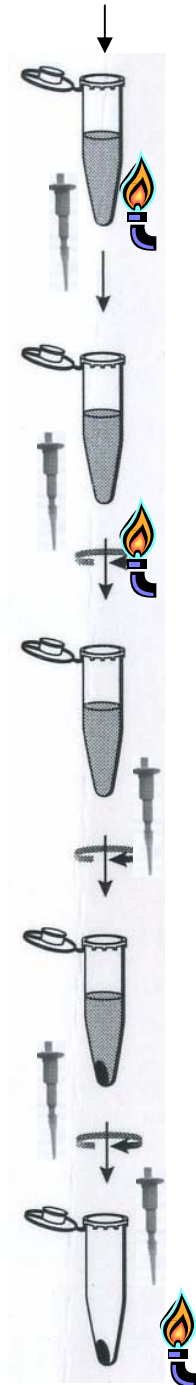
Fuente: Directiva del Consejo de UE, 1998

Anexo 5. Procedimiento *kit* ACL-Immunostrips para *R. solanacearum* agdia®.



Fuente: Manual Instructivo *kit* ACL-Immunostrips para *Rs.* Agdia ®

Anexo 6. Procedimiento aislamiento de ADN con el *kit Wizard* de Promega® a partir de tejido vegetal.



1. Tomar tejido vegetal congelar a -70°C y macerar hasta pulverizar. Pesar 40 mg y colocarlo en un tubo.

2. Agregar 600 μl de la solución de lisis "*Nuclei lysis Solution*". Agite en un vortex por 3 segundos

3. Incubar a 65°C por 15 minutos

4. Agregar 3 μl de la solución de ARNasa y agitar invirtiendo el tubo

5. Incubar a 37°C por 15 minutos, y luego deje enfriar la muestra a temperatura ambiente por 5 minutos. Agregar 200 μl de la solución de precipitación de proteínas y agitar a alta velocidad por 20 segundos

6. Centrifugue a 16 000 g por 3 minutos

7. Transfiera el sobrenadante a un nuevo que contenga 600 μl de isopropanol a temperatura ambiente. Mezcle invirtiendo el tubo varias veces

8. Centrifugue a 13000 g por 2 minutos

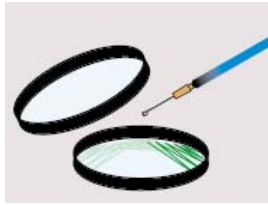
9. Decante el sobrenadante cuidadosamente y lave el botón con 600 μl de etanol al 70% a temperatura ambiente

10. Invierta el tubo varias veces y centrifugue a 13000 g por 2 minutos. Luego decante el alcohol cuidadosamente

11. Seque el botón invirtiendo el tubo sobre papel por 15 minutos. Resuspenda el ADN en 100 μl de la solución de rehidratación. Incube la muestra a 65°C por una hora o déjelo a 4°C de un día para otro

Fuente: Manual Instructivo *kit* de aislamiento de ADN *Wizard* de Promega®

Anexo 7. Procedimiento aislamiento de ADN con el *kit Wizard* de Promega® a partir de cultivo bacteriano.



1. Tomar una colonia con el asa

2. Resuspender la colonia en 600 ul de la solución de lisis "*Nuclei lysis Solution*"

3. Incubar a 80° C por 5 minutos

4. Agregar 3 ul de la solución de ARNasa

5. Agregar 200 ul de la solución de precipitación proteica y agite fuertemente por 20 segundos. Incube en hielo por 5 minutos y centrifugue a 16000 g por 3 minutos

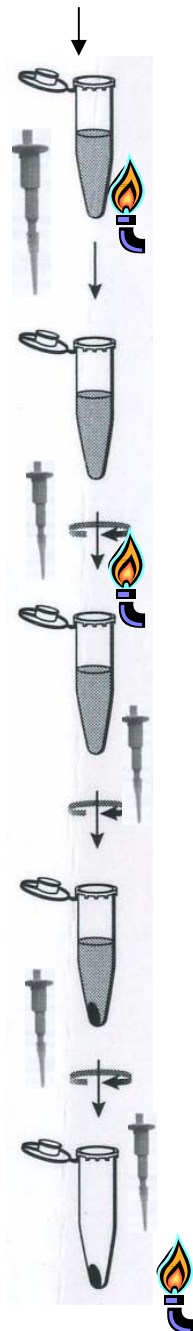
6. Transfiera el sobrenadante a un tubo limpio que contenga 600 ul de isopropanol a temperatura ambiente

7. Agiten suavemente invirtiendo el tubo y centrifugue a 13000 g por 2 minutos

8. Decante el sobrenadante cuidadosamente y lave el botón con 600 ul de etanol al 70% a temperatura ambiente

9. Invierta el tubo varias veces y centrifugue a 13000 g por 2 minutos. Luego decante el alcohol cuidadosamente

10. Seque el botón invirtiendo el tubo sobre papel por 15 minutos. Resuspenda el ADN en 100 ul de la solución de rehidratación. Incube la muestra a 65° C por una hora o déjelo a 4° C de un día para otro



Fuente: Manual Instructivo *kit* de aislamiento de ADN *Wizard* de Promega®.

Anexo 8. Lista de plagas cuarentenarias para la NAPPO (zona norteamericana); se resalta *R. solanacearum*.

Nombre científico	Nombre común	Canadá	México	EE.UU.
Virus				
Virus latente andino de la papa (APLV)		QA	QA	QA
Virus moteado andino (APMoV)		QA	QA	QA
Arracacha virus B - oca strain (AVB-O)		QA	QA	QA
Virus rizado apical de la remolacha (BCTV)		QA	QA	QP
Mosaico deformante de la papa (Brasil) (PDMV)		QA	QA	QA
Virus T de la papa (PVT)		QA	QA	QA
Virus U de la papa (PVU)		QA	QA	QA
Virus V de la papa (PVV)		QA	QA	QA
Virus Y de la papa, variedad Yc (PVYc)		QA	QA	QA
Amarillamiento de las nervaduras (PYVV)		QA	QA	QA
Virus del amarillamiento de la papa (PYV)		QA	NR	QA
Enrollamiento apical de las hojas de solanum		NR	NR	QA
Mancha anular del tabaco - variedad calico (TRSV-		QA	QA	QA
Estriado del tabaco, variedad papa (TSV)		NR	QA	NR
Marchitez manchada del tomate (TSWV)		NR	QA	NR
Viroides				
Viroides del tubérculo fusiforme de la papa (PSTVd)		QP	QA	QP
Bacterias				
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>	Pudrición anular del tubérculo	RNQ	QA	RNQ
<i>Erwinia chrysanthemi</i> (raza papa)		RNQ	QA	RNQ
<i>Ralstonia solanacearum</i> cepa 3	Vaquita de la papa	QA	QA	QA
Hongos				
<i>Angiosorus (Thecaphora) solani</i>	Carbón	QA	QA	QA
<i>Oospora pustulans</i> (sin. <i>Polyscytalum pustulans</i>)	Mancha de la cáscara	RNQ	QA	RNQ
<i>Puccinia pittieriana</i> P. Henn	Roya común	QA	NR	QA
<i>Synchytrium endobioticum</i> (Schilbersky) Percival	Verruga de la papa	QP	QA	QA
Nematodos				
<i>Ditylenchus destructor</i> Thome	Pudrición seca de la papa	QP	QA	QP
<i>Ditylenchus dipsaci</i> (raza papa y maíz)	N. del tallo y bulbo	QA	QA	RNQ
<i>Globodera pallida</i> (Stone) Behrens	N. enquistador	QP	QA	QA
<i>Globodera rostochiensis</i> (Wollenweber) Behrens	Nematodo dorado	QP	QP	QP
<i>Meloidogyne chitwoodi</i> (Golden et al, 1980)	Nematodo agallador	QA	QP	RNQ
Insectos				
<i>Premnotypes</i> spp.	Gusano blanco	NR	QA	NR
<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	Escarabajo de la papa	QP	QA	NR

NR: No reglamentada

QA: Plaga cuarentenaria, no está presente (ausente) en un área (NIMF N° 19).

QP: Plaga cuarentenaria, presente pero no está extendida y se encuentra bajo control oficial (NIMF N° 19)

QT: Plaga cuarentenaria transitoria

RNQ: Plaga no cuarentenaria reglamentada

NAPPO, 2003

Fuente:

Anexo 9. Anticuerpos, imprimadores y sondas aceptables para la detección serológica y molecular de plagas cuarentenarias de la papa según la NAPPO. Se resalta *R. solanacearum* y los imprimadores usados en este trabajo.

Plaga	Prueba	Reactivo para detección	Referencia
<i>C. m. sepedonicus</i>	Inmunofluorescencia	Monoclonal 9A1 (Agdia)	De Boer y Wieczorek (1984)
	ELISA	Monoclonal 1H3 (Agdia)	De Boer <i>et al</i> (1988)
	PCR	Primers: Sp1f, Sp5r	Li y De Boer (1995)
		Primers: CMS6, CMS7	Schneider <i>et al</i> (1993)
		Estuches de primers: Cms50, Cms72, Cms85	Mills <i>et al</i> (1997)
	Nested PCR	Primers: CMSIF1, CMSIR1, CMSIF2, CMSIR2	Lee <i>et al</i> (1997)
	RT-PCR	Primers/sondas: Cms 50-2F, Cms133R, CMS 50-53T	Schaad <i>et al</i> (1999)
<i>E. chrysanthemi</i>	ELISA	Monoclonal 6A6	Singh <i>et al</i> (2000)
	PCR	Primers: ADE1, ADE2	Nassar <i>et al</i> (1996)
<i>E. c. atroseptica</i>	ELISA	Monoclonal 4F6 (Agdia)	De Boer y McNaughton (1987)
		Monoclonal 6G6 (IVIA)	Gorris <i>et al</i> (1994)
	PCR	Primers: ECA1f, ECA2r	De Boer y Ward (1995)
		Primers: Y45, Y46 (Probelia)	Frechon <i>et al</i> (1995)
<u><i>R. solanacearum</i></u>	Inmunofluorescencia	Polyclonal: IACR-276; Adgen 1091; IPO-9523	Elphinstone <i>et al</i> (2000)
	ELISA	Monoclonal 6.9-D5	Singh y Trevors (2001)
		Polyclonal IACR-278; Adgen 1091	Elphinstone <i>et al</i> (2000)
	PCR	Primers: PS96-H, PS96-I	Seal <i>et al</i> (1992)
		Primers: OLI-1, Y-2	Seal <i>et al</i> (1993)
	RT-PCR	Primers/sondas: B2-I-F, B2-II-R, B2-P	Weller <i>et al</i> (2000)
	Aislamiento	Medium: SMSA	Elphinstone <i>et al</i> (1996)
PSTVd	Probe	Agdia	
	RT-PCR	Primers: no identificado	Shamloul <i>et al</i> (1997)

Fuente: NAPPO, 2003

Anexo 10. Cuantificación de las extracciones de ADN llevadas a cabo en el presente estudio.

1. Extracciones de planta con el protocolo original.

Muestra	Dilución	ADN ng/ul	Relación A260/A280
Ge-01	1:500	100,0	0,8
Ge-02	1:500	25,0	-
Ge-03	1:500	25,0	-
Ge-04	1:500	50,0	0,67
Tc-01	1:500	0	-
Tc-02	1:500	0	-
Tc-03	1:500	0	-
Tc-04	1:500	0	-
Ts-01	1:500	0	-
Ts-02	1:500	0	-
Ts-03	1:500	0	-
Ts-04	1:500	0	-

2. Extracciones de planta con los cambios al protocolo

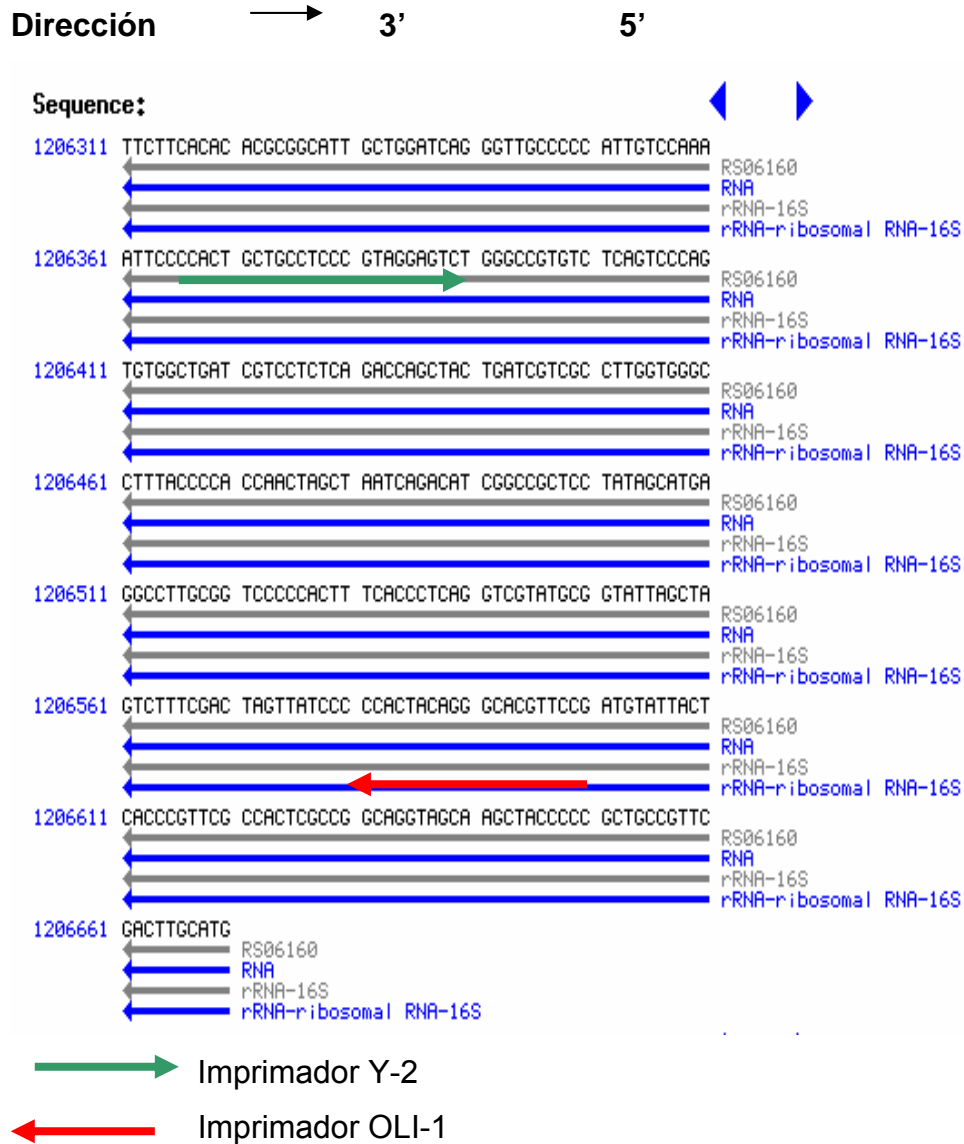
Muestra	Dilución	ADN ng/ul	Relación A260/A280
Ts-01	1:500	256,1	1,28
Ts-02	1:500	150,0	1,50
Ts-03	1:500	0	-
Ts-04	1:500	150,0	2,0

3. Extracciones de cultivo (únicamente colonias que mostraron resultados positivos en la prueba rápida con el *kit immunostrips* y el control positivo)

Muestra	Dilución	ADN ng/ul	Relación A260/A280
Aislamiento Yas, Cartago	1:500	50,0	0,5
Aislamiento finca 1 Sarchí (maceración)	1:500	125,0	0,71
Aislamiento finca 1 Sarchí (exudado)	1:500	225,0	1,8
Control positivo, ICMP #8049	1:500	125,3	0,71

Fuente: Datos de laboratorio

Anexo 11. Región del ADN de *R. solanacearum* amplificada por los imprimadores OLI-1 y Y-2



Fuente: NCBI:48221:1206311-1206661 *Ralstonia solanacearum* GMI1000 plasmid pGMI1000MP, complete sequence